

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 29 日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/063224 A1(51) 国際特許分類:
33/50, 33/15 // C12N 15/09 C07K 14/705, G01N

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016176

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 17 日 (17.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-7657 2003 年 1 月 15 日 (15.01.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 清水 孝雄
(SHIMIZU, Takao) [JP/JP]; 〒113-0021 東京都 文京区 本駒込 1-26-10-411 Tokyo (JP). 石井 聡
(ISHII, Satoshi) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都 文京区
本郷 3-38-11-1102 Tokyo (JP). 野口 響子
(NOGUCHI, Kyoko) [JP/JP]; 〒113-0024 東京都 文京
区 西片 2-19-14-501 Tokyo (JP).(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 15 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL LYSOPHOSPHATIDIC ACID RECEPTOR

(54) 発明の名称: 新規リゾホスファチジン酸受容体

(57) Abstract: It is intended to provide a novel receptor of LPA and a method of screening a drug such as an LPA receptor antagonist using the same. Use as a lysophosphatidic acid (LPA) receptor comprising a G protein-coupled protein p2y9. More specifically, use of the G protein-coupled protein p2y9 as a lysophosphatidic acid (LPA) receptor. A method of screening an agonist or an antagonist to the LPA receptor as described above by using the receptor.

(57) 要約: 本発明は、LPA の新規な受容体を提供するものであり、それを用いた LPA 受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニング方法を提供する。本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 からなるリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体としての用途に関する。より詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 のリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体としての使用に関する。また、本発明は、前記した本発明の LPA 受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

WO 2004/063224 A1

明 細 書

新規リゾホスファチジン酸受容体

技術分野

本発明は、新規なリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) の受容体に関する。より詳細には、本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体、リゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体としての使用、及びそれを用いて当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は、グリセロリン脂質の 1 種であり、グリセリン骨格のひとつの水酸基に脂質が結合した物質である。LPA は、グリセロリン脂質がホスホリパーゼなどの作用により、グリセロリン脂質の 2 個の脂質部分のうちの 1 個の脂質部分が加水分解されて生ずる物質であり、1-アシルグリセロール-3-リン酸、2-アシルグリセロール-3-リン酸、1-アルケニル-グリセロール-3-リン酸などが LPA の代表例として知られている。

LPA は、生体内においては極微量しか存在せず、グリセロリン脂質の生合成の中間体や分解物である程度の認識しかされていなかったけれども、近年になって LPA が様々な生理活性を有し、特に血清中に存在する脂質性の増殖因子の主要な成分であることが明らかにされて (先行技術文献 2 2 参照) からは、生理活性脂質の 1 種として注目を集めてきた。

LPA は、細胞増殖促進作用を有し、障害を受けた組織の修復に必要な物質であることが見出され、また、LPA には、神経細胞の成熟化に必要な神経突起を退縮させる作用や、ある種の癌細胞の浸潤を誘導する作用がことも報告されている。さらに、LPA は、平滑筋収縮作用、血小板凝集作用、細胞死の抑制、細胞の走化性の亢進作用など、様々な組織において様々な作用を有していることが知

られてきた。さらに、血漿中のL P Aを検出して卵巣がんを検出する方法（先行技術文献1参照）や、試料中のL P Aなどのリゾリン酸を測定する方法（先行技術文献2参照）や、L P Aを特異的に加水分解するリゾホスファチジン酸ホスファターゼの製造方法（先行技術文献3参照）や、ヒトリゾホスファチジン酸ホスファターゼのクローニング（先行技術文献4参照）などに関する特許出願も行われてきている。

このようにL P Aは、単に中間物や分解物ではなく、それ自身が様々な生理活性を有するメディエーターの1種であることがわかってきた。したがって、L P Aは、血小板活性化因子（P A F）やスフィンゴシン1リン酸（S 1 P）などと共に「リゾリン脂質メディエーター」の1種であると考えられるようになってきた。

L P Aは、細胞膜表面に存在するGタンパク質共役型の受容体（G-protein-coupled receptor；G P C R）に結合してその生理作用を発現すると考えられてきた。即ち、L P Aの受容体は7回膜貫通型のG P C Rであると考えられていたが、その実体は長らく不明であった。それは、L P Aがリゾリン脂質の1種であり、脂溶性の物質であることから、膜との結合実験が非常に難しいことや、よいアンタゴニストが存在しないことなどから、受容体の存在そのものも疑問視されていたからである。

しかし、1996年に、L P Aの受容体としてv z g - 1（先行技術文献23参照）、及びP S P 24（先行技術文献24参照）と命名されたL P Aの受容体遺伝子がクローニングされた。v z g - 1は、マウス脳の発生過程の脳質層において細胞周期に伴って神経芽細胞のエレベーター運動が観察され、この細胞に特異的な7回膜貫通型のG P C Rであることから、v z g - 1（ventricular zone gene-1）と命名された。v z g - 1は、それまでに単離されていたヒツジ由来のオーファン受容体であるe d g - 2遺伝子のマウスホモログであることがわかり、現在ではe d g - 2遺伝子として知られている。

そして、E S Tデータベース上では、e d g - 2（v z g - 1）の他に、e d g - 1、e d g - 3、e d g - 4遺伝子などの多くの相同性を示す配列が登録されており、これらが一群のE D G（endothelial cell differentiation gene）フ

ファミリ-を形成することが明らかになった。このEDGファミリ-は、その相同性から2つのグループに細分され、その1つはedg-2及びedg-4などのLPAのレセプターとして機能するグループであり、他のひとつはedg-1及びedg-3などのS1P（スフィンゴシン1リン酸）の受容体として機能するものである。

また、PSP24遺伝子は、前述してきたedg-2遺伝子とはアミノ酸配列上、相同性がほとんど無いが、マウス神経系やヒト胎児脳においても相同遺伝子が発現しており、この遺伝子産物もLPAに対する反応性を有することから独立のグループを形成すると考えられている。また、アフリカツメガエル卵母細胞のPSP24遺伝子の塩基配列に基づいて、ヒト成人の脳組織のcDNAライブラリーからヒト型のPSPS24遺伝子も見出されている（先行技術文献5参照）。

EDGファミリ-やPSP24は、GPCRの1種であり、第1図に現在までに知られているGPCRを示す。第1図はこれらのタンパク質のアミノ酸配列の相同性に基づいて相同性の大きいものを近くに配置し、相同性の小さいものを遠くに配置した系統樹である。第1図中の数字は各タンパク質間の相同性の低さを示す尺度となる相対値である。また、第1図中の黒丸印は、脂質の受容体として知られているものを示し、灰色は脂質以外の受容体として知られているものを示し、それらの外側にリガンドとなる物質の総称が記載されている。EDGファミリ-は第1図中では右下側に表示されている。また、PSP24はほぼ中央の下側に示されている。第1図中の白丸印はそのリガンドが未だ知られていないオーファン受容体であることを示している。

本発明のGPCRであるpy9は、第1図中では左側の下方に表示されており、従来のEDGファミリ-やPSP24とはアミノ酸配列の相同性が全く異なるものであることが第1図からもわかる。

GPCRについては現在でも新規なものが見出されており、例えば、特開2002-355045号（先行技術文献6）、特開2002-17378号（先行技術文献7）などの特許出願（先行技術文献8～18参照）として公開されている。また、GPCRの機能を改変させる方法（先行技術文献19参照）や、G2A受容体の転写の調節方法（先行技術文献20参照）や、GPCR活性のスクリ

ーニング方法（先行技術文献 21 参照）についても特許出願がされてきている。

本願の発明に関連する先行技術文献としては次のものがあり、これは参照して本明細書中に取り込まれる。

1. 特開 2002-328132 号
2. 特開 2002-017398 号
3. 特開 2000-152782 号
4. 再表 WO00/031275 号
5. 再表 WO99/024569 号
6. 特開 2002-355045 号
7. 特開 2002-17378 号
8. 特開 2001-245674 号
9. 特開 2001-245673 号
10. 特開 2001-245672 号
11. 特開 2001-211889 号
12. 特開 2001-190281 号
13. 特開 2001-186888 号
14. 特開 2001-169786 号
15. 特開 2001-161385 号
16. 特開 2001-161383 号
17. 特開 2001-161382 号
18. 特表 2002-501083 号
19. 特表 2002-523091 号
20. 特表 2001-523456 号
21. 特表平 11-505718 号
22. フォン コルベン イーら、セル、59 巻、45-54 頁、1989 年
(van Corven E., et al., Cell, 59, 45-54 (1989))
23. ヘチャト ジェー エイチら、ジャーナル セル バイオロジー、
135 巻、1071-1083 頁 (1996 年) (Hecht, J.H., et al.,

J. Cell. Biol., 135, 1071-1083 (1996))

24. グオ ゼットら、プロシーディング ナショナル アカデミック サイエンス ユーエスエー、93巻、14367-14372頁、
1996年 (Guo, Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14367-14372 (1996))

発明の開示

LPAは生体内において様々な生理活性を有するリゾリン脂質メディエーターの1種であるが、その受容体については未だ十分に解明されておらず、LPAの受容体を解明することは、LPAが関与する様々な生理活性作用や各種の疾患の治療や予防に重要なことである。したがって、LPAの新規な受容体を得ることができれば、新しいタイプのLPA受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニングや評価など幅広く医薬品の開発に利用することができる。

本発明は、LPAの新規な受容体を提供するものであり、それを用いたLPA受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニング方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、GPCRの系統樹である。第1図中の任意の2つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いが近縁であることを示す。

第2図は、本発明のp2y9を細胞に導入するためのベクターの例を示す。第2図の例は、HAタグの付いたp2y9をコードするDNAをpCXN2.1ベクターのKpnIとNheIの間に組み込んだ発現ベクターを示す。

第3図は、各受容体のCHO細胞のクローンを用いて、10 μ MのLPAによる各細胞のカルシウム濃度の変化を詳細に検討した結果を示す。第3図の縦軸はカルシウム濃度(RFU)を示し、横軸は時間(秒)を示す。第3図中の黒丸印(●)はGPR34の場合を示し、白四角印(□)はp2y5の場合を示し、白三角印(△)はp2y9の場合を示し、バツ印(×)はp2y10の場合をそれぞれ示している。

第4図は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体

を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第4図の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第4図の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34（黒塗り）、p2y5（ドット入り）、p2y9（横線入り）、及びp2y10（白抜き）をそれぞれ示している。

第5図は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第5図の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第5図の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34（黒塗り）、p2y5（ドット入り）、p2y9（横線入り）、及びp2y10（白抜き）をそれぞれ示している。

第6図は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第6図の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第6図の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34（黒塗り）、p2y5（ドット入り）、p2y9（横線入り）、及びp2y10（白抜き）をそれぞれ示している。

第7図は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第7図の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第7図の各添加物における4本の棒グラフは左から、

G P R 3 4（黒塗り）、p 2 y 5（ドット入り）、p 2 y 9（横線入り）、及び p 2 y 1 0（白抜き）をそれぞれ示している。

第 8 図は、G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9、及び p 2 y 1 0 の 4 種の受容体を各々安定的に発現している C H O クロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリック A M P（c A M P）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第 8 図の縦軸は c A M P の濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第 8 図の各添加物における 4 本の棒グラフは左から、G P R 3 4（黒塗り）、p 2 y 5（ドット入り）、p 2 y 9（横線入り）、及び p 2 y 1 0（白抜き）をそれぞれ示している。第 8 図の左から 5 番目が L P A の場合である。

第 9 図は、G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9、及び p 2 y 1 0 の 4 種の受容体を各々安定的に発現している C H O クロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリック A M P（c A M P）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第 9 図の縦軸は c A M P の濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第 9 図の各添加物における 4 本の棒グラフは左から、G P R 3 4（黒塗り）、p 2 y 5（ドット入り）、p 2 y 9（横線入り）、及び p 2 y 1 0（白抜き）をそれぞれ示している。

第 1 0 図は、G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9、及び p 2 y 1 0 の 4 種の受容体を各々安定的に発現している C H O クロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリック A M P（c A M P）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。第 1 0 図の縦軸は c A M P の濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第 1 0 図の各添加物における 4 本の棒グラフは左から、G P R 3 4（黒塗り）、p 2 y 5（ドット入り）、p 2 y 9（横線入り）、及び p 2 y 1 0（白抜き）をそれぞれ示している。第 1 0 図の右端はコントロールである。

第 1 1 図は、p 2 y 9 を安定的に発現している 4 つの C H O 細胞のクローン、

0 1、# 0 9、# 1 5、及び# 2 0 の内のクローン# 0 1 について、種々の濃度の L P A を加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。グラフの横軸は L P A の濃度 (n M) を示し、縦軸はカルシウムの増加量 (n M) を示す。第 1 1 図中の黒菱形印 (◆) は各クローンの場合を示し、黒四角印 (■) は陰性対照の場合を示す。

第 1 2 図は、p 2 y 9 を安定的に発現している 4 つの C H O 細胞のクローンのうちの # 0 9 について、種々の濃度の L P A を加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。グラフの横軸は L P A の濃度 (n M) を示し、縦軸はカルシウムの増加量 (n M) を示す。第 1 2 図中の黒菱形印 (◆) は各クローンの場合を示し、黒四角印 (■) は陰性対照の場合を示す。

第 1 3 図は、p 2 y 9 を安定的に発現している 4 つの C H O 細胞のクローンのうちの # 1 5 について、種々の濃度の L P A を加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。グラフの横軸は L P A の濃度 (n M) を示し、縦軸はカルシウムの増加量 (n M) を示す。第 1 3 図中の黒菱形印 (◆) は各クローンの場合を示し、黒四角印 (■) は陰性対照の場合を示す。

第 1 4 図は、p 2 y 9 を安定的に発現している 4 つの C H O 細胞のクローンのうちの # 2 0 について、種々の濃度の L P A を加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。グラフの横軸は L P A の濃度 (n M) を示し、縦軸はカルシウムの増加量 (n M) を示す。第 1 2 図中の黒菱形印 (◆) は各クローンの場合を示し、黒四角印 (■) は陰性対照の場合を示す。

第 1 5 図は、C H O 細胞のクローン、# 0 1、# 0 9、# 1 5、及び# 2 0 の各々について、細胞内のカルシウム濃度の変化をトロンピン (0. 1 N I H 単位 / m l)、P A F (1 μ M)、及び A T P (1 0 μ M) について検討した結果を示す。第 1 5 図の縦軸はカルシウムの増加量 (n M) を示し、横軸は各添加物を示す。各棒グラフは、左から陰性対照のベクターのみを導入した C H O 細胞、p 2 y 9 のクローン# 0 1、クローン# 0 9、クローン# 1 5、クローン# 2 0 をそれぞれ示している。

第 1 6 図は、p 2 y 9 または p 2 y 5 を安定的に発現している C H O 細胞のクローンを用いて、百日咳毒素 (P T X) の存在下又は非存在下で、種々の濃度の

L P Aを加えたときの細胞内 c A M P 濃度を測定した結果を示す。第 1 6 図はフォルスコリン (5 μ M) で処理しなかった場合である。図の横軸は L P A の濃度 (μ M) を示し、縦軸は c A M P の濃度の変化の比を示す。各図の黒四角印 (■) は p 2 y 9 のクローンの場合であり、黒三角印 (▲) は p 2 y 5 のクローンの場合を示す。黒菱形印 (◆) は陰性対照のベクターのみのクローンの場合を示す。各図の実線は、百日咳毒素 (P T X) の非存在下の場合であり、破線は百日咳毒素 (P T X) の存在下の場合である。

第 1 7 図は、p 2 y 9 または p 2 y 5 を安定的に発現している C H O 細胞のクローンを用いて、百日咳毒素 (P T X) の存在下又は非存在下で、種々の濃度の L P A を加えたときの細胞内 c A M P 濃度を測定した結果を示す。第 1 6 図の場合と同様であるが、第 1 7 図の場合はフォルスコリン (5 μ M) で処理した場合である。図の横軸は L P A の濃度 (μ M) を示し、縦軸は c A M P の濃度の変化の比を示す。各図の黒四角印 (■) は p 2 y 9 のクローンの場合であり、黒三角印 (▲) は p 2 y 5 のクローンの場合を示す。黒菱形印 (◆) は陰性対照のベクターのみのクローンの場合を示す。各図の実線は、百日咳毒素 (P T X) の非存在下の場合であり、破線は百日咳毒素 (P T X) の存在下の場合である。

第 1 8 図は、本発明の p 2 y 9 と p 2 y 5 とのアミノ酸配列の相同性を示す。第 1 8 図の上の段は p 2 y 9 であり、下の段は p 2 y 5 である。アミノ酸が同じ位置に有る場合には両者の間にアスタリスク (*) が付されている。

第 1 9 図は、p 2 y 5 又は本発明の p 2 y 9 が導入された R H 7 7 7 7 細胞を用いて、L P A との結合を、陰性対照の場合、p 2 y 5 の場合、及び p 2 y 9 の場合について測定した場合の、第 1 9 図は陰性対照の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされた L P A の添加量 (n M) であり、縦軸は測定された放射能の量 (d p m) を示す。グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印 (▲) は、特異的結合量を示している。

第 2 0 図は、第 1 9 図の場合と同様に、p 2 y 5 又は本発明の p 2 y 9 が導入された R H 7 7 7 7 細胞を用いて、L P A との結合を測定した結果であって、第 2 0 図は p 2 y 5 の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされた L P A の添加量 (n M) であり、縦軸は測定された放射能の量 (d p m) を示す。各グ

ラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印（▲）は、特異的結合量を示している。

第21図は、第19図の場合と同様に、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたRH7777細胞を用いて、LPAとの結合を測定した結果であって、第21図は本発明のp2y9の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量（nM）であり、縦軸は測定された放射能の量（dpm）を示す。各グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印（▲）は、特異的結合量を示している。

第22図は、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたB103細胞を用いて、LPAとの結合を、陰性対照の場合、p2y5の場合、及びp2y9の場合について測定した場合の、第22図は陰性対照の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量（nM）であり、縦軸は測定された放射能の量（dpm）を示す。各グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印（▲）は、特異的結合量を示している。

第23図は、第22図の場合と同様に、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたB103細胞を用いて、LPAとの結合を測定した結果であって、第23図はp2y5の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量（nM）であり、縦軸は測定された放射能の量（dpm）を示す。各グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印（▲）は、特異的結合量を示している。

第24図は、第22図の場合と同様に、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたB103細胞を用いて、LPAとの結合を測定した結果であって、第24図は本発明のp2y9の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量（nM）であり、縦軸は測定された放射能の量（dpm）を示す。各グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印（▲）は、特異的結合量を示している。

第25図は、RH7777細胞から得られた一過性にp2y9受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、LPA以外の脂質との反応性を測定した結果を示すものである。第25図中のバッファーはトリチウムラベルされたLPAだけを

用いた総結合量を示す対照である。第25図の縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示し、横軸は添加した各脂質を示す。

第26図は、本発明の p2y9 を導入した RH7777 細胞から得られた一過性に p2y9 受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、p2y9 に対する LPA の結合の動力学的検討を行った結果を示すものである。第26図は p2y9 が導入された細胞の膜を用いた場合の結果を示す。第26図のグラフの横軸はトリチウムラベルされた LPA の濃度 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) である。各グラフでは、総結合量を黒四角印 (■) で示し、非特異的結合量を黒菱形印 (◆) で示し、特異的結合量は白丸印 (○) で示されている。

第27図は、第26図と同様に、本発明の p2y9 を導入した RH7777 細胞から得られた一過性に p2y9 受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、p2y9 に対する LPA の結合の動力学的検討を行った結果を示すものであり、第27図は陰性対照の場合を示す。第27図のグラフの横軸はトリチウムラベルされた LPA の濃度 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) である。各グラフでは、総結合量を黒四角印 (■) で示し、非特異的結合量を黒菱形印 (◆) で示し、特異的結合量は白丸印 (○) で示されている。

第28図は、第26図及び第27図の結果から得られた動力学パラメーターを求めるためのグラフを示す。第28図の横軸は結合 (fmol/mg) を示し、縦軸は結合と解離の比 (fmol/mg/nM) を示す。

第29図は、PC12細胞を用いて p2y9 の作用をルシフェラーゼアッセイにより検討した結果を示すものである。第29図の横軸は LPA の濃度 (nM ~ μ M) を示し、縦軸は比を示す。黒四角印 (■) は p2y9 を導入した PC12 細胞の場合を示し、黒菱形印 (◆) は陰性対照の場合を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、第1図に示される種々の Gタンパク質共役型受容体のアミノ酸配列の相同性をもとに構築した系統樹における、血小板活性化因子受容体 (PAFR) に相同性があるオーファン受容体 (第1図の左側に示される。) について検討してきた。その結果、意外なことに血小板活性化因子受容体 (PAFR) に相

同性があるオーファン受容体のひとつである p 2 y 9 が、血小板活性化因子（P A F）よりも L P A に対して強く反応することを見出した。即ち、本発明者らは、従来知られている L P A 受容体とは全くタイプの異なる新たな L P A 受容体を見出し、本発明を完成した。

本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸（L P A）受容体としての用途に関する。より詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 のリゾホスファチジン酸（L P A）受容体としての使用に関する。さらに詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 が配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである p 2 y 9 のリゾホスファチジン酸（L P A）受容体としての使用に関する。

また、本発明は、前記した本発明の L P A 受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 がリゾホスファチジン酸（L P A）の受容体として機能するものであることを明らかにするものである。即ち、L P A が Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 のリガンドとして機能することを明らかにするものである。

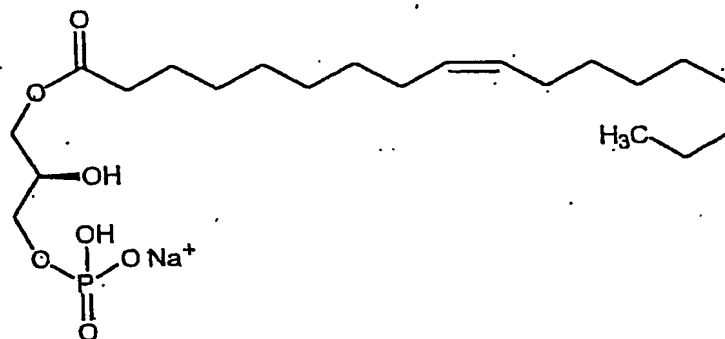
本発明者らは、血小板活性化因子受容体（P A F R）に相同性があるオーファン受容体のうち G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9（別名 G P R 2 3）、及び p 2 y 1 0 に注目し、これらのリガンドを検討してきた。これらの受容体は、いずれも血小板活性化因子受容体（P A F R）とアミノ酸配列において相同性を有していることから、血小板活性化因子（P A F）又はその関連物質をリガンドとしていることが予想されていたが、p 2 y 9（別名 G P R 2 3）は、血小板活性化因子（P A F）又はその関連物質とは反応性を示さず、意外にも L P A と大きな反応性を示し、L P A をリガンドとする受容体であることを見出した。p 2 y 9 のアミノ酸配列は、L P A 受容体として従来から知られている E D G - 2、E D G - 4、E D G - 7、及び P S P S 2 4 とはほとんど相同性を有しておらず、このことは第 1 図の系統樹からも理解されるとおりであり、従来から知られている L P A 受容体とは全く異なる新しいタイプの L P A 受容体を見出したことになる。

本発明者らは、G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9（別名 G P R 2 3）、及び p

2 y 1 0 のそれぞれのアミノ酸配列のN末端にHAタグと呼ばれる9アミノ酸残基からなる外来のペプチドを付加したアミノ酸配列をコードするDNAを、それぞれ p C X N 2 . 1 ベクターに組み込み、CHO細胞にトランスフェクションし、細胞表面上のHAタグの発現レベルが高いクローンを選択して、これらを安定的に発現するクローンを得た。

第2図に、HAタグの付いた p 2 y 9 をコードするDNAを p C X N 2 . 1 ベクターの K p n I と N h e I の間に組み込んだ発現ベクターを示す。他の受容体についても、それぞれ同様にベクターを構築した。実験に使用した p 2 y 9 は 3 7 0 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、このアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。

また、これらの実験で使用した L P A としては、次の式、



で示される、1-オレオイル-LPAを用いた。

各受容体のCHOクローンを用いて、200種以上の脂質（バイオモル社脂質ライブラリー由来）やヌクレオチドについて、CHO細胞のカルシウム濃度の変化についてのスクリーニングを行った。このスクリーニングに際しては、ポジティブコントロールとして1 μ MのATP、10 μ MのATP、及び100 μ MのATPを使用した。これは、CHO細胞はもともとATP受容体を発現しているため、ATPの添加によりカルシウム濃度が大きく変化する。この実験では、このポジティブコントロール、即ち、ATPの添加によりいずれの濃度の場合にも、測定機器の針が振り切れる程大きな細胞内カルシウム濃度の変化が認められた。このことは、この実験自体がうまくいっていることの証明になっている。

一方、トランスフェクションにより、発現している受容体に特異的な細胞内のカルシウム濃度の上昇は、p 2 y 9 を発現したクローンがLPAと反応したとき

に認められた。このスクリーニングにより、p2y9をコードするDNAをトランスフェクションしたCHO細胞に大きなカルシウム濃度の変化が見られることがわかった。

さらに、各受容体のCHO細胞のクローンを用いて、10 μ MのLPAによる各細胞のカルシウム濃度の変化を詳細に検討した結果を第3図に示す。第3図の縦軸はカルシウム濃度(RFU)を示し、横軸は時間(秒)を示す。第3図中の黒丸印(●)はGPR34の場合を示し、白四角印(□)はp2y5の場合を示し、白三角印(△)はp2y9の場合を示し、バツ印(×)はp2y10の場合をそれぞれ示している。

この結果からも明らかなように、10 μ MのLPAによりp2y9のみが特異的にカルシウム濃度の増加を示すこと、即ち、LPAがp2y9のリガンドになっていることがわかった。

次に、これらの4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクローンの細胞を用いて、細胞内のサイクリックAMP(cAMP)の濃度変化について検討した。バイオモル社の脂質ライブラリーの中からの59種類の脂質、及び17種類のヌクレオチド類を用いて、それぞれ室温で30分間反応させた。

結果を第4図～第10図に示す。使用した脂質類及びヌクレオチド類は各図に記載のとおりである。第4図～第10図の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。第10図の右端はコントロールである。第4図～第10図に各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34(黒塗り)、p2y5(ドット入り)、p2y9(横線入り)、及びp2y10(白抜き)をそれぞれ示している。

この結果、第8図の左から5番目に示されるように、LPAに対するp2y9の場合は、有意にcAMPの濃度の上昇がみられることがわかった。

次に、CHO細胞のクローンについて検討した。p2y9を安定的に発現している4つのCHO細胞のクローン、#01、#09、#15、及び#20の各々について、細胞内にカルシウムを取り込ませる実験を行った。種々の濃度のLPAを加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐

性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を第11図～第14図にそれぞれ示す。各グラフの横軸はLPAの濃度(nM)を示し、縦軸はカルシウムの増加量(nM)を示す。第11図は#01のクローンの場合であり、第12図は#09のクローンの場合であり、第13図は#15のクローンの場合であり、第14図は#20のクローンの場合である。第11図～第14図のグラフにおける黒菱形印(◆)は各クローンの場合を示し、黒四角印(■)は陰性対照の場合を示す。

CHO細胞は、元々LPA受容体を持っている細胞であるから、ベクターのみを導入した細胞であってもLPAに対して反応する。しかし、p2y9が導入されたいずれのクローンにおいても、LPAの濃度依存的にp2y9が導入されたクローンのほうが顕著に細胞内のカルシウム濃度が増加することがわかった。

同様に、細胞内のカルシウム濃度の変化をトロンピン(0.1NIH単位/ml)、PAF(1 μ M)、及びATP(10 μ M)について検討した結果を第15図に示す。第15図の縦軸はカルシウムの増加量(nM)を示し、横軸は各添加物を示す。各棒グラフは、左から陰性対照のベクターのみを導入したCHO細胞(黒塗り)、p2y9のクローン#01(ドット入り)、クローン#09(斜線入り)、クローン#15(白抜き)、クローン#20(横線入り)の各場合をそれぞれ示している。

この結果、トロンピン、PAF、及びATPについては、p2y9を導入した細胞も陰性対照の細胞と変わりが無いことがわかった。

次に、p2y9またはp2y5を安定的に発現しているCHO細胞のクローンを用いて、百日咳毒素(PTX)の存在下又は非存在下で、種々の濃度のLPAを加えて室温で30分間処理したときの細胞内cAMP濃度を測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を第16図及び第17図に示す。第16図はcAMPを上昇させる作用を有するフォルスコリン(5 μ M)で処理しなかった場合であり、第17図はフォルスコリン(5 μ M)で処理した場合である。各図の横軸はLPAの濃度(μ M)を示し、縦軸はcAMPの濃度の変化の比を示す。各図の黒四角印(■)は

p 2 y 9 のクローンの場合であり、黒三角印 (▲) は p 2 y 5 のクローンの場合を示す。黒菱形印 (◆) は陰性対照のベクターのみのクローンの場合を示す。各図の実線は、百日咳毒素 (P T X) の非存在下の場合であり、破線は百日咳毒素 (P T X) の存在下の場合である。

この結果、p 2 y 9 は L P A に反応して c A M P の濃度を上昇させるが、p 2 y 5 及び陰性対照では L P A に対して c A M P の濃度の上昇はみられなかった。G タンパク質 G i / G o の阻害剤である百日咳毒素 (P T X) の存在により (各図の破線で示される場合。)、c A M P の濃度の上昇レベルは増強した。これは、C H O 細胞が元々持っている L P A 受容体が百日咳毒素 (P T X) に感受性を持っており、かつ c A M P の濃度を下降させる作用があるためと考えられる。また、フォルスコリンの存在下 (第 16 図の (B)) では、p 2 y 9 の L P A に対する c A M P の濃度の上昇が増強されている。

p 2 y 5 は、344 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、p 2 y 9 とは 56.2% の相同性がある。両者のアミノ酸の比較を第 18 図に示す。第 18 図の上の段は p 2 y 9 であり、下の段は p 2 y 5 である。アミノ酸が同じ位置に有る場合には両者の間にアスタリスク (*) が付されている。両者は比較的相同性が高いにもかかわらず、L P A に対する反応性を全く異にしており、血小板活性化因子受容体 (P A F R) に相同性があるタンパク質 (第 1 図の系統樹において左側に示されている。) の中でも、本発明の p 2 y 9 のみが L P A に対して特異的に作用するものであることがわかる。

C H O 細胞は元々 L P A 受容体を持っている細胞であるが、次に元々は L P A 受容体を持っていない細胞について p 2 y 9 を導入して、その反応性を検討した。L P A 受容体を持っていない細胞として、R H 7 7 7 7 細胞及び B 1 0 3 細胞を使用した。

p C X N 2. 1 ベクターに挿入された H A タグ付きの p 2 y 9 または p 2 y 5 をコードする DNA を、R H 7 7 7 7 細胞または B 1 0 3 細胞へトランスフェクションし、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分を得た。陰性対照サンプルでは、受容体をコードする DNA の代わりに p C X N 2. 1 ベクターをトランスフェクションしたものを使用した。この膜画分を、それぞれの濃度における総

結合量を求めるために、1 nM、3 nM、又は10 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ、4℃で60分間反応させた。これと平行して、それぞれの濃度における非特異的結合量を求めるために、500倍濃度のトリチウムラベルされていないLPAを含んだ反応液でも、膜面分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。反応液をGF/Cガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。

結果を第19図～第21図、及び第22図～第24図に示す。第19図～第21図はRH7777細胞を用いた場合であり、第22図～第24図はB103細胞を用いた場合である。第19図及び第22図は陰性対照の場合を示し、第20図及び第23図はp2y5の場合を示し、第21図及び第24図はp2y9の場合をそれぞれ示す。各グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量(nM)であり、縦軸は測定された放射能の量(dpm)を示す。各グラフの斜線の棒は総結合量であり、その右側の白色の棒は非特異的結合量である。黒三角印(▲)は、総結合量から非特異的結合量を引いて求めた特異的結合量を示している。

この結果、p2y9はいずれの細胞においてもLPAと特異的に結合するものであることがわかった。

このトランスフェクションしたRH7777細胞から得られた一過性に受容体を発現する細胞由来の膜面分を用いて、p2y9の他の脂質との反応性を検討した。

前記した方法で得られた膜面分を、5 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ、4℃で60分間反応させた。この値を、LPAだけの総結合量として対照とした(得られた値は、第25図のグラフ内では“バッファー”と記載している。)。これと平行して、1 μMのトリチウムラベルされていない種々の脂質(LPC: リゾフォスファチジルコリン、LPE: リゾフォスファチジルエタノールアミン、LPS: リゾフォスファチジルセリン、LPG: リゾフォスファチジルグリセロール、PA: フォスファチジン酸、PAF: 血小板活性化因子、

S 1 P : スフィンゴシン 1 - リン酸、S P C : スフィンゴシルフォスフォリルコリン) をそれぞれ含む、5 n M のトリチウムラベルされた L P A を同様に反応させた。

反応後、反応液を G F / C ガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされた L P A の量とした。

結果を第 2 5 図に示す。第 2 5 図の縦軸は測定された放射能の量 (d p m) を示し、横軸は添加した各脂質を示す。

L P A と一緒に添加されたこれらの脂質が、L P A と同様に p 2 y 9 と親和性を有するものであるならば、多量に添加されたこれらの脂質が競争的に p 2 y 9 に結合し、結果的にラベルされた L P A の p 2 y 9 への結合が阻害され、ラベルされた L P A の結合量が減少することになる。しかし、第 2 5 図に示されるように、p 2 y 9 とラベルされた L P A の結合量は、L P A 以外の他の脂質により減少しておらず、調べた脂質は全て p 2 y 9 への親和性が L P A ほど高くないことが示された。即ち、p 2 y 9 は、これらの脂質よりも L P A と特異的に結合するものであることが示された。

次に、前記で使用してきた R H 7 7 7 7 細胞から得られた一過性に受容体を発現する細胞由来の膜面分を用いて、p 2 y 9 に対する L P A の結合の動力学的検討を行った。

R H 7 7 7 7 細胞由来の膜面分を、種々の濃度のトリチウムラベルされた L P A と混ぜ合わせ、4℃で60分間反応させて、総結合量を求めた。これと平行して、10 μ M のトリチウムラベルされていない L P A を含んだ反応液でも、膜面分とトリチウムラベルされた L P A を同様に反応させて、非特異的結合量を求めた。反応液を G F / C ガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされた L P A の量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードする DNA の代わりに p C X N 2 . 1 ベクターをトランスフェクションしたものを用いた。

結果を第 2 6 図及び第 2 7 図に示す。第 2 6 図は p 2 y 9 が導入された細胞の

膜を用いた場合であり、第 27 図は陰性対照の場合である。第 26 図及び第 27 図の各グラフの横軸はトリチウムラベルされた L P A の濃度 (n M) であり、縦軸は測定された放射能の量 (d p m) である。各グラフの黒四角印 (■) は総結合量を示し、黒菱形印 (◆) は非特異的結合量を示す。白丸印 (○) は、総結合量から非特異的結合量を引いて求めた特異的結合量を示す。

これらの結果から得られた動力学パラメーターを求めるためのグラフを第 28 図に示す。トリチウムラベルされた L P A の比活性は 2 1 0 9 G B q / m m o l (5 7 C i / m m o l) であった。第 28 図の横軸は結合 (f m o l / m g) を示し、縦軸は結合と解離の比 (f m o l / m g / n M) を示す。この結果得られた直線の式は、

$$y = -0.0223x + 831.19$$

であった。

この結果、p 2 y 9 と L P A との K d 値は、4 4 . 8 n M であり、B m a x は 3 7 . 3 p m o l / m g タンパク質であった。

さらに、P C 1 2 細胞を用いて p 2 y 9 の作用を検討した。

P C 1 2 細胞に、以下の (1) ~ (3) の 3 種の D N A を同時にトランスフェクションした。

(1) p C X N 2 . 1 ベクターに挿入された H A タグ付きの p 2 y 9 をコードする D N A。

(2) ラットの z i f プロモーターに発現が制御されたホタルのルシフェラーゼ D N A。z i f プロモーターは細胞外からの刺激に応じて活性化する。

(3) 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターに発現が制御されたウミシイタケのルシフェラーゼ D N A。チミジンキナーゼプロモーターは外来の刺激に関係なく、常に一定の活性を持つ。

得られたトランスフェクタントに、種々の濃度の L P A で細胞を 6 時間刺激したときのホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を求め、これらの値をもとにウミシイタケルシフェラーゼに対するホタルのルシフェラーゼ活性値の比を算出した。陰性対照サンプルでは、p 2 y 9 をコードする D N A の代わりに p C X N 2 . 1 ベクターをトランスフェクションしたものをを用いた。

結果を第29図に示す。第29図の横軸はLPAの濃度（nM～μM）を示し、縦軸は比を示す。黒四角印（■）はp2y9を導入したPC12細胞の場合を示し、黒菱形印（◆）は陰性対照の場合を示す。

zifプロモーターやチミジンキナーゼプロモーターは、細胞内のcAMPの濃度の上昇やカルシウムの濃度の上昇により作動するプロモーターであり、この結果、p2y9は、PC12細胞においてもLPAに対して濃度依存的に反応していることがわかった。また、この結果からすれば、PC12細胞はLPA受容体を元々は持っていないか、持っているとしてもかなり感受性の低い受容体であることも示された。

以上のことから、p2y9はLPAの受容体であることが明確になった。p2y9は第1図のGPCRの系統樹からも明らかなように、従来LPAの受容体として知られていたEDGファミリーやPSP24とは相同性のないものであり、本発明は全く新しいタイプのLPAの受容体を提供するものである。また、従来PAF受容体と相同性があるp2y9が、PAFとは相違しているLPAの受容体として機能しているという本発明の知見は、GPCRの系統樹に対する新たな知見を提供するものでもある。

本発明は、p2y9がLPAの受容体であるという、p2y9の新たな機能及び用途を提供するものである。

本発明のp2y9としては、ヒト型のもの、マウス型のものなどp2y9として機能するものであればよく、好ましいp2y9としては配列表の配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。このアミノ酸配列は、この全配列に限定されるものではなく、その一部のアミノ酸が欠失し、また一部のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、また他のアミノ酸が付加され、又はこれらが同時に組み合わされたアミノ酸配列を有するものであってもp2y9としての機能を有するものであればよい。

本発明のLPAとしては、前記の実験で使用されてきた1-オレオイル-LPAに限定されるものではなく、グリセリンの3位の水酸基にリン酸基が結合し、1位又は2位のいずれかの水酸基にアシル基、アルケニル基、アルキル基などが結合したものであればよく、これらの誘導体であってもよく、p2y9に対する

反応性を有するLPAであればよい。

本発明においては、グリセリンの1位にアシル基が結合したLPAを1-アシル-LPAと称し、グリセリンの2位にアシル基が結合したLPAを2-アシル-LPAと称する。同様に、アルケニル基の場合には1-アルケニル-LPA、2-アルケニル-LPAと称し、アルキル基の場合には、1-アルキル-LPA、2-アルキル-LPAと称する。グリセリンに結合するアシル基としては、例えば、飽和又は不飽和の脂肪酸から誘導されるアシル基が好ましく、具体的にはパルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、オレイン酸、アラキドン酸などから誘導されるアシル基が挙げられる。アルケニル基としては、例えば、炭素数10～30、好ましくは炭素数14～22の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルケニル基が挙げられ、当該アルケニル基は1個以上、好ましくは1個の不飽和結合を有するものが挙げられる。アルケニル基の例としては、1-ヘキサデセニル基、1-オクタデセニル基などが挙げられる。アルキル基としては、例えば炭素数10～30、好ましくは炭素数14～22の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキル基が挙げられる。アルキル基の例としては、ヘキサデシル基、オクタデシル基などが挙げられる。

本発明は、p2y9がLPAの受容体であることから、LPAによって亢進又は抑制される各種の生理活性を、本発明のp2y9を用いてスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法は、p2y9を細胞に発現させて行ってもよいし、既にp2y9を有する細胞を用いてもよいし、またp2y9を有する膜を使用してもよい。本発明のスクリーニング方法は、前記で例示したいずれの方法に限定されるものではないが、いずれの方法においても、p2y9をLPAの受容体として、LPAに対する活性物質をスクリーニングする方法を包含するものである。

なお、特願2003-007657明細書に記載された内容を、本明細書にすべて取り込む。

実施例

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (CHO細胞への受容体の導入)

N末端に9アミノ酸残基からなるHAタグを付加したGPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種のオーファン受容体をコードするDNAをそれぞれpCXN2.1ベクター(第2図参照)に組み込み、インビトロジェン社のリポフェクトアミンプラスでCHO細胞にトランスフェクションした。培養は10%ウシ胎児血清を含むHamF-12培地を用いた。2g/Lのネオマイシン存在下で1個のCHO細胞由来の細胞群(クローン)を増殖させた後、細胞表面上のHAタグの発現レベルが高いクローンをフローサイトメトリー解析で複数選択し、それぞれの受容体の安定的発現クローンを得た。

実施例 2 (種々の脂質に対する各クローンのカルシウム濃度の変化の測定)

GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の各受容体のCHOクローン1つずつについて、1ウェル当たり 4×10^4 個の細胞を96穴プレート3枚に播いた。翌日、4 μ Mのフルオ3(カルシウムインジケーター)と37℃で1時間保温し、細胞内にフルオ3を取り込ませた。その後、約200種類の脂質分子から構成されているバイオモル社の脂質ライブラリーの各脂質(1~10 μ M)やATP等の17種類のヌクレオチド類(1~100 μ M)と反応させ、モレキュラーデバイス社のフレックスステーションを用いて細胞内カルシウム濃度の時間変化を追った。

CHO細胞はもともとATP受容体を発現しているので、ATPを添加したクローンでは振り切れる程大きな細胞内カルシウム濃度の変化が認められた。これにより、この実験の正当性を確認することができた。

一方、ATPのような全てのクローンにおいてではなく、発現している受容体特異的な細胞内カルシウム上昇は、p2y9を発現したクローンがLPAと反応したときに認められた。

実施例 3 (L P A に対する各クローンのカルシウム濃度の変化の測定)

G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9、及び p 2 y 1 0 の 4 種の受容体各々を安定的に発現している C H O クローンの細胞を用いて、実施例 2 に記載の方法と同様にして、各細胞内のカルシウムの濃度の変化を測定した。

結果を第 3 図に示す。

実施例 4 (各クローンによる c A M P の濃度の変化の測定)

G P R 3 4、p 2 y 5、p 2 y 9、及び p 2 y 1 0 の 4 種の受容体各々を安定的に発現している C H O クローンの細胞を、5 m M H E P E S - N a O H (p H 7. 4)、0. 1 % B S A、5 0 0 μ M I B M X (c A M P 分解酵素阻害剤) を含む H B S S に懸濁した。1 x 1 0⁵ 個ずつの細胞を 3 8 4 穴プレートに播き、5 0 μ M フォルスコリン (受容体非依存的に c A M P 合成酵素を活性化する薬剤) の共存下で、上記バイオモル社の脂質ライブラリーの中からの 5 9 種類または 1 7 種類のヌクレオチド類と室温で 3 0 分間反応させた。その後、細胞内サイクリック A M P (c A M P) 濃度をパッカー社のアルファースクリーン c A M P アッセイキットを使って測定した。

結果を第 4 図～第 1 0 図に示す。

p 2 y 9 を発現している C H O 細胞が L P A に反応したときに、大きな c A M P 濃度の上昇が認められた (第 8 図参照)。

実施例 5 (p 2 y 9 のクローンの比較)

p 2 y 9 を安定的に発現している C H O クローン、# 0 1、# 0 9、# 1 5、及び # 2 0 の 4 種について、1 0 % ウシ胎児血清を含む H a m F - 1 2 から 0. 1 % B S A を含む H a m F - 1 2 に培地を切り替え 2 4 時間培養した。その後 3 μ M フラ 2 (カルシウムインジケーター) と 0. 0 1 % クレモフォア E L を含む H E P E S - タイロド緩衝液 (1 4 0 m M N a C l、2. 7 m M K C l、1 m M C a C l₂、1 2 m M N a H C O₃、5. 6 m M D - グルコース、0. 4 9 m M M g C l₂、0. 3 7 m M N a H₂P O₄、2 5 m M H E P E S - N a O H (p H 7. 4)) で細胞を懸濁した。これを 3 7 °C で 1 時間保温し、細

胞内にフラ2を取り込ませた。 1×10^6 個/ml の濃度になるよう再び HEPES-タイロド緩衝液に細胞を懸濁し、種々の濃度の LPA を加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を、日本光電社製の CAF-100 を用いて測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1 ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得した CHO 細胞を用いた。

結果を第 11 図～第 14 図にそれぞれ示す。

実施例 6 (p2y9 の各クローンによるトロンビン等に対する反応性)

p2y9 を安定的に発現している CHO クローン、#01、#09、#15、及び #20 の 4 種を用いて、LPA に代えて、トロンビン 0.1 NIH 単位/ml 、PAF $1 \mu\text{M}$ 、ATP $10 \mu\text{M}$ をそれぞれ添加して、実施例 5 と同様にして各クローンの細胞内のカルシウム濃度の増加を測定した。

結果を第 15 図に示す。トロンビン、PAF、及び ATP のいずれの場合も、陰性対照と比べて大きな相違は見られなかった。

実施例 7 (p2y9 のクローンと p2y5 のクローンの比較)

10% ウシ胎児血清の代わりに、0.1% BSA を含む HamF-12 培地で 24 時間培養した p2y9 または p2y5 を安定的に発現している CHO クローン 1 つずつを、5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、0.1% BSA、500 μM IBMX を含む HBSS に懸濁した。5 μM フォルスコリンで処理する場合は、 1×10^5 個ずつ、処理しない場合は 1×10^6 個ずつを 384 穴プレートに播いた。その後、種々の濃度の LPA を加えて室温で 30 分間処理したときの細胞内 cAMP 濃度を、パッカー社製のアルファースクリーン cAMP アッセイキットを使って測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1 ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得した CHO 細胞を用いた。

結果を第 16 図及び第 17 図にそれぞれ示す。

実施例 8 (RH7777 細胞または B103 細胞による p2y9 及び p2y5

の発現と、L P Aに対する反応性)

p C X N 2 . 1 ベクターに挿入されたH A タグ付きの p 2 y 9 または p 2 y 5 をコードするD N A をインビトロジェン社のリポフェクトアミン 2 0 0 0 によって、R H 7 7 7 7 細胞またはB 1 0 3 細胞へトランスフェクションした。2 4 時間後に 1 0 % ウシ胎児血清を含むD M E M から、0 . 1 % B S A を含むD M E M に培地を切り替え、さらに 2 4 時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー (2 5 m M H E P E S - N a O H (p H 7 . 4) 、 1 0 m M M g C l ₂ 、 0 . 2 5 M シュークロース) に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、8 0 0 x g で遠心分離し、上清をさらに 1 0 0 , 0 0 0 x g の超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜面分とした。

5 0 μ g のタンパク質を含む膜面分を、0 . 2 5 % B S A を含む結合バッファー中で、各濃度での L P A の総結合量を求めるために、1 n M 、 3 n M 、及び 1 0 n M のトリチウムラベルされた L P A と混ぜ合わせ (計 2 0 0 μ l) 、 4 ° C で 6 0 分間反応させた。これと平行して、各濃度での L P A の非特異的結合量を求めるために、5 0 0 倍濃度のトリチウムラベルされていない L P A を含んだ反応液で、膜面分とトリチウムラベルされた L P A を同様に反応させた。

反応液をパッカー社製の G F / C ガラスフィルターで濾過し、さらにこれを 0 . 2 5 % B S A を含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされた L P A の量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードする D N A の代わりに p C X N 2 . 1 ベクターをトランスフェクションした。

R H 7 7 7 7 細胞についての結果を第 1 9 図～第 2 1 図に示し、B 1 0 3 細胞についての結果を第 2 2 図～第 2 4 図にそれぞれ示す。

実施例 9

p C X N 2 . 1 ベクターに挿入されたH A タグ付きの p 2 y 9 または p 2 y 5 をコードするD N A をインビトロジェン社のリポフェクトアミン 2 0 0 0 によっ

て、RH7777細胞へトランスフェクションした。24時間後に10%ウシ胎児血清を含むDMEMから、0.1%BSAを含むDMEMに培地を切り替え、さらに24時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー(25mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、10mM MgCl₂、0.25M シュークロース)に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、800 x gで遠心分離し、上清をさらに100,000 x gの超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分とした。

20 μ gのタンパク質を含む膜画分を、0.25%BSAを含む結合バッファー中で、LPAの総結合量を求めるために、5 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ(計200 μ l)、4℃で60分間反応させた(この結果を、第25図中では“バッファー”と記載している。)。これと平行して、5 nMのトリチウムラベルされたLPAと、1 μ Mのトリチウムラベルされていない種々の脂質(LPC: リゾフォスファチジルコリン、LPE: リゾフォスファチジルエタノールアミン、LPS: リゾフォスファチジルセリン、LPG: リゾフォスファチジルグリセロール、PA: フォスファチジン酸、PAF: 血小板活性化因子、S1P: スフィンゴシン1-リン酸、SPC: シフィンゴシルフォスホリルコリン)を含む反応液で、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。

各反応液をパッカー社(GF/C)ガラスフィルターで濾過し、さらにこれを0.25%BSAを含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。

結果を第25図に示す。添加した脂質がp2y9に親和性を有していれば、p2y9にLPAと競争的に結合し、その結果LPAのp2y9への結合が阻害され、トリチウムラベルされたLPAの結合量が減少することになるが、実験の結果は第25図に示されるように、LPA以外の調べた脂質は全てp2y9への親和性がLPAほど高くないことが示された。

実施例 10 (p2y9 に対する LPA の結合の動力学的考察)

pCXN2. 1 ベクターに挿入された HA タグ付きの p2y9 をコードする DNA をインビトロジェン社のリポフェクトアミン 2000 によって、RH7777 細胞へトランスフェクションした。24 時間後に 10% ウシ胎児血清を含む DMEM から、0.1% BSA を含む DMEM に培地を切り替え、さらに 24 時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー (25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、0.25 M シュークロース) に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、800 x g で遠心分離し、上清をさらに 100,000 x g の超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分とした。

40 μ g のタンパク質を含む膜画分を、種々の濃度での LPA の総結合量を求めるために、0.25% BSA を含む結合バッファー中で種々の濃度のトリチウムラベルされた LPA と混ぜ合わせ (計 200 μ l)、4℃ で 60 分間反応させた。これと平行して、種々の濃度での LPA の非特異的結合量を求めるために、10 μ M のトリチウムラベルされていない LPA を含んだ反応液で、膜画分とトリチウムラベルされた LPA を同様に反応させた。

反応液をパッカー社 (Packer) の GF/C ガラスフィルターで濾過し、さらにこれを 0.25% BSA を含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされた LPA の量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードする DNA の代わりに pCXN2.1 ベクターをトランスフェクションした。

結果を第 26 図及び第 27 図にそれぞれ示す。さらに、p2y9 に対する LPA の結合をまとめたグラフを第 28 図に示す。トリチウムラベルされた LPA の比活性は 2109 GBq/mmol (57 Ci/mmol) であった。この図に示されるように、結果はほぼ直線上に乗り、当該直線の式は、 $y = -0.0223x + 831.19$ であった。

この結果、p2y9 と LPA との K_d 値は、44.8 nM であり、B_{max} は

37.3 pmol/mgタンパク質であった。

実施例 11 (PC12細胞によるルシフェラーゼ分析)

10%ウマ血清と5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地から、0.5%ウマ血清と0.25%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に交換したPC12細胞に対し、以下の3種のDNAを同時にトランスフェクションした。

(1) pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9をコードするDNA。

(2) ラットのzifプロモーターに発現が制御されたホタルのルシフェラーゼDNA。

(3) 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターに発現が制御されたウミシイタケのルシフェラーゼDNA。

トランスフェクションの試薬はキアゲン社のスーパーフェクトを用いた。2 x 10⁵個ずつの細胞を24穴プレートに播き、48時間培養した。その後、培地を0.1%BSAを含むDMEM培地に交換し、さらに12時間培養した。

種々の濃度のLPAで細胞を6時間刺激したときのホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を、東洋インキ社のピッカジーンデュアルシーパンジーキットとベルトールド社のルミノメーターLB9506によって求め、これらの値をもとにウミシイタケに対するホタルのルシフェラーゼ活性値の比を算出した。陰性対照サンプルでは、p2y9をコードするDNAの代わりにpCXN2.1ベクターをトランスフェクションした。

結果を第29図に示す。

産業上の利用可能性

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は、血小板活性化因子 (PAF) やスフィンゴシン1リン酸 (S1P) などと共に「リゾリン脂質メディエーター」の1種であると考えられており、細胞増殖促進作用、神経細胞の成熟化に必要な神経突起を退縮させる作用、癌細胞の浸潤を誘導する作用、平滑筋収縮作用、血小板凝集作用、細胞死の抑制、細胞の走化性の亢進作用など、様

々な組織において様々な作用を有していることが知られてきている。しかし、その作用機構や受容体については、十分な説明がされていなかった。L P Aの生体内での作用機構を説明することは、L P Aが関与している様々な生理作用についての障害を治癒するために必要であり、L P Aの作用機構の説明が求められていた。

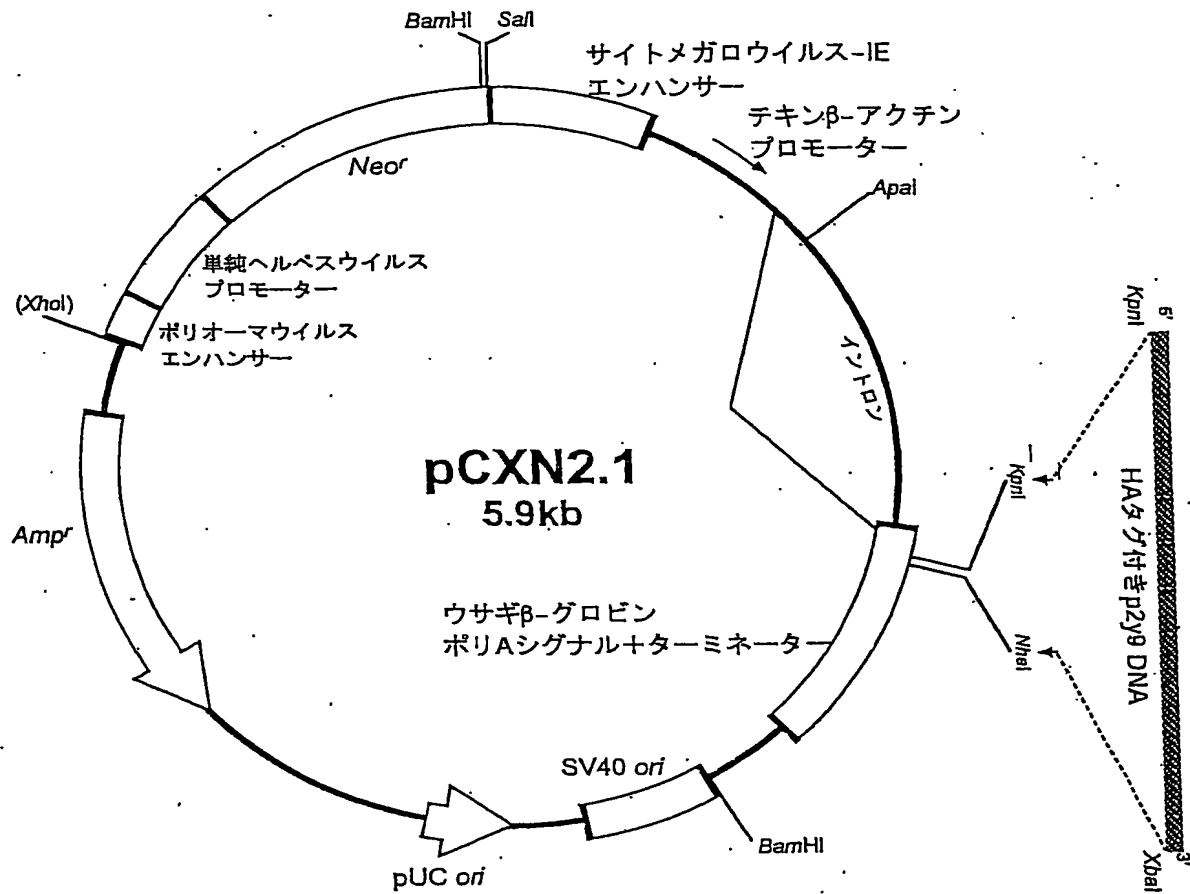
本発明は、L P Aの新しいタイプの受容体を明らかにするものである。L P Aの受容体を説明したことにより、L P Aの関与する様々な生理作用についての新しい医薬品や診断薬の開発に有効なスクリーニング手法を提供するものである。また、本発明により明らかにされたL P A受容体であるp 2 y 9は、L P Aの受容体として従来から知られていたE D GファミリーやP S P 2 4とはアミノ酸配列の相同性がほとんど無いものであり、L P Aの幅広い生理作用の説明に新たな分野を提供するものである。

請 求 の 範 囲

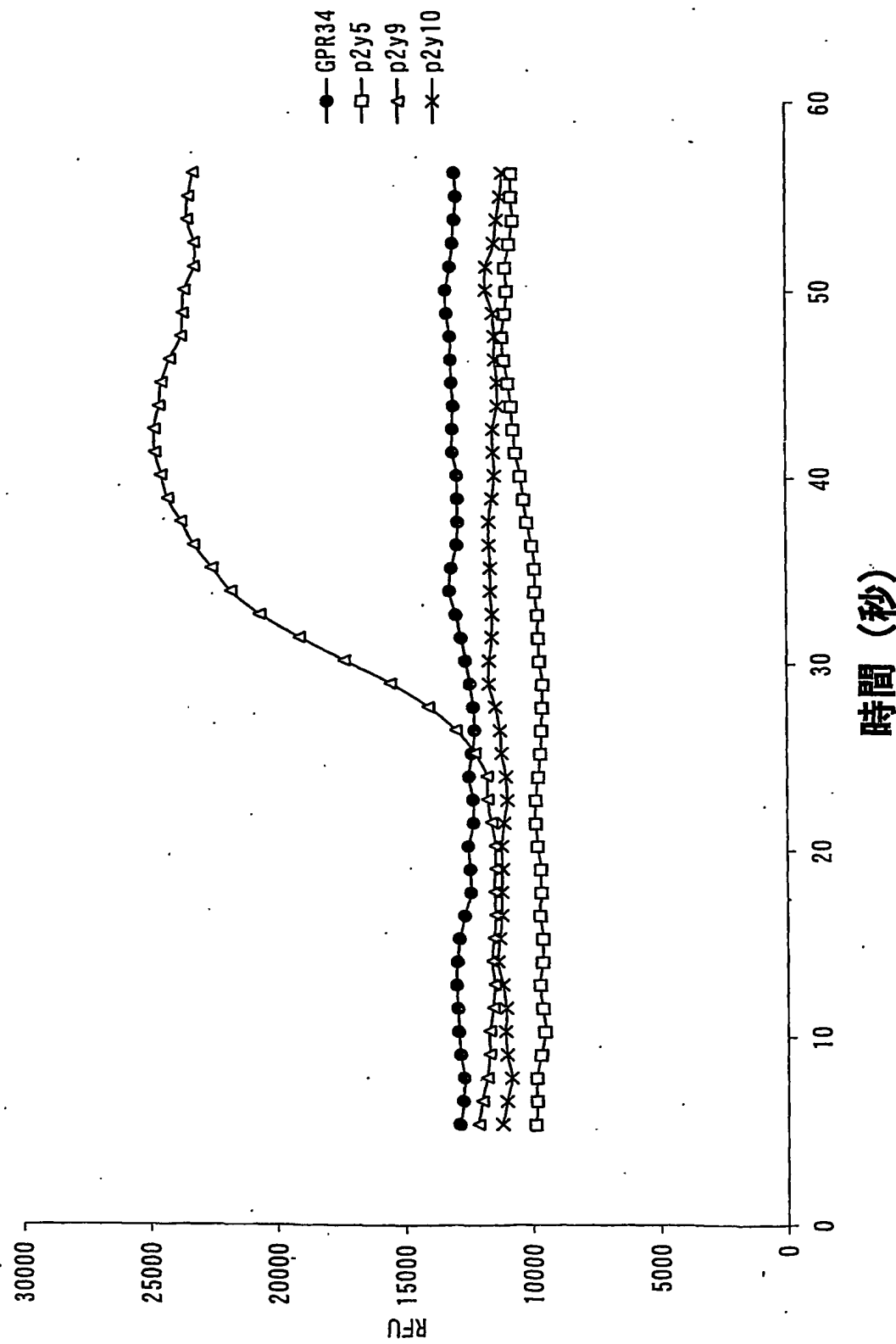
1. Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体。
2. L P A が、1 - アシル - L P A である請求の範囲第 1 項に記載の L P A 受容体。
3. p 2 y 9 が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の L P A 受容体。
4. Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 の、リゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体としての使用。
5. L P A が、1 - アシル - L P A である請求の範囲第 4 項に記載の使用。
6. p 2 y 9 が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである請求の範囲第 4 項又は第 5 項に記載の使用。
7. 請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の L P A 受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法。
8. 癌細胞の浸潤に対する拮抗物質をスクリーニングする方法である請求の範囲第 7 項に記載の方法。

[illegible]

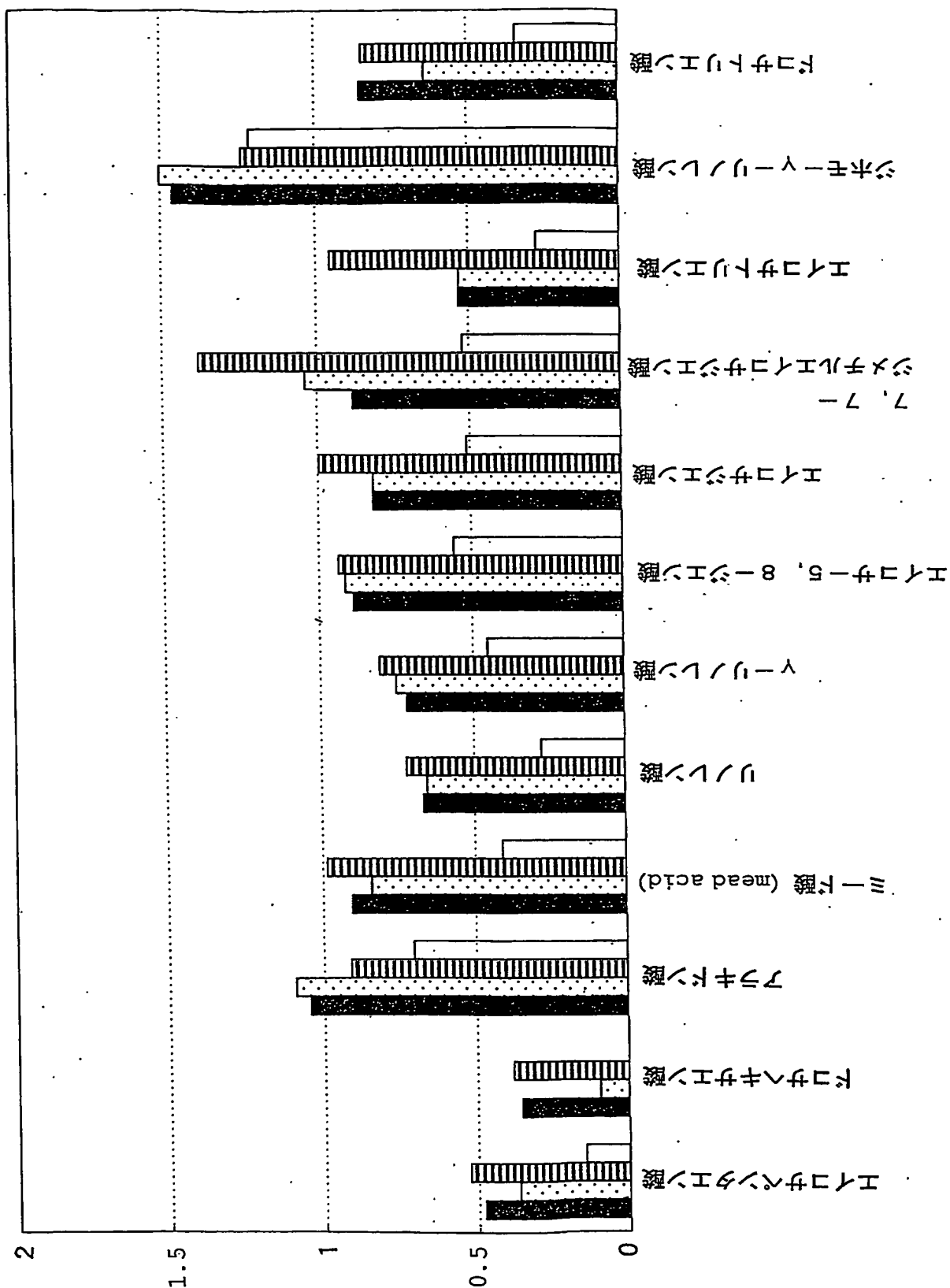
第 2 図



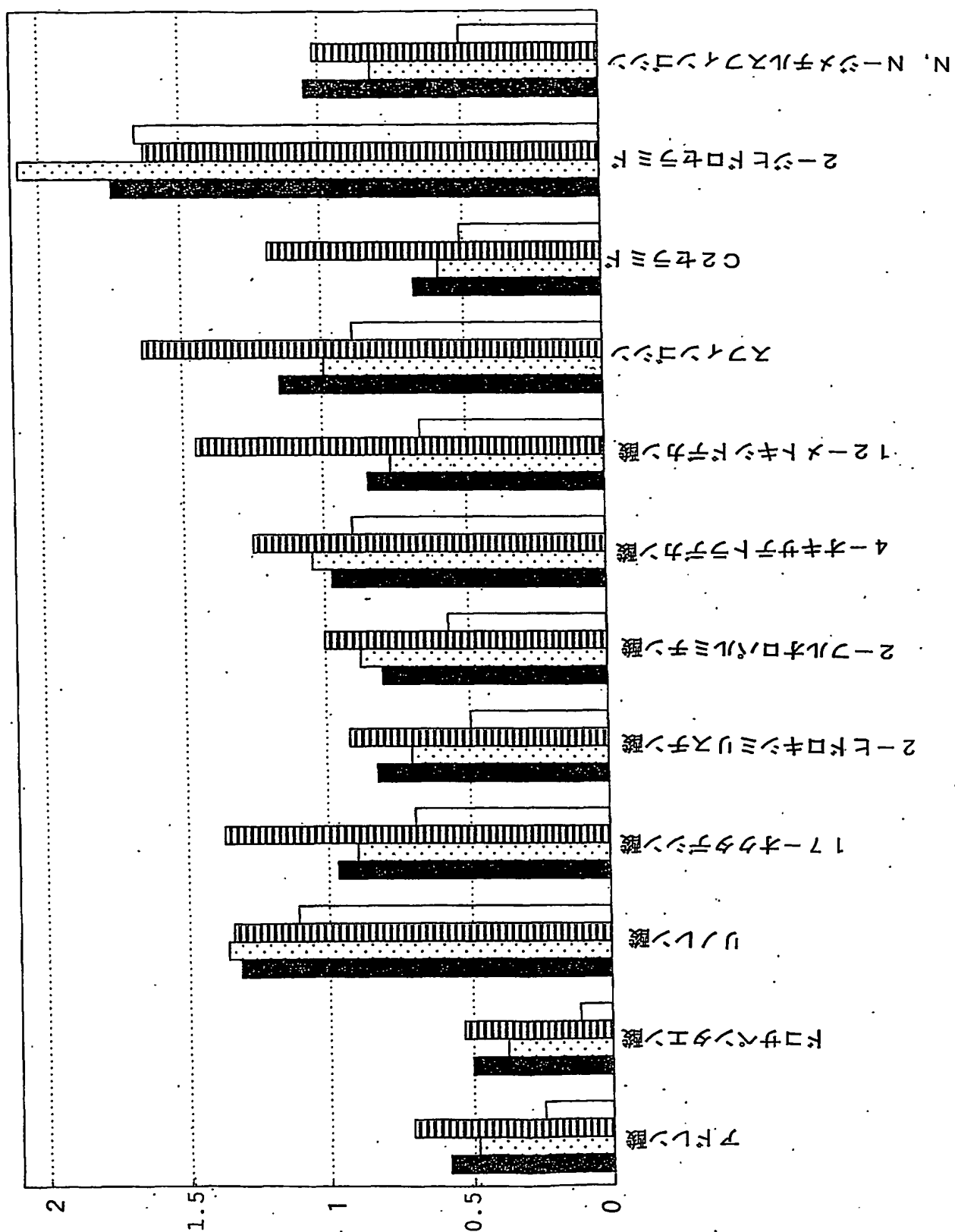
第 3 図



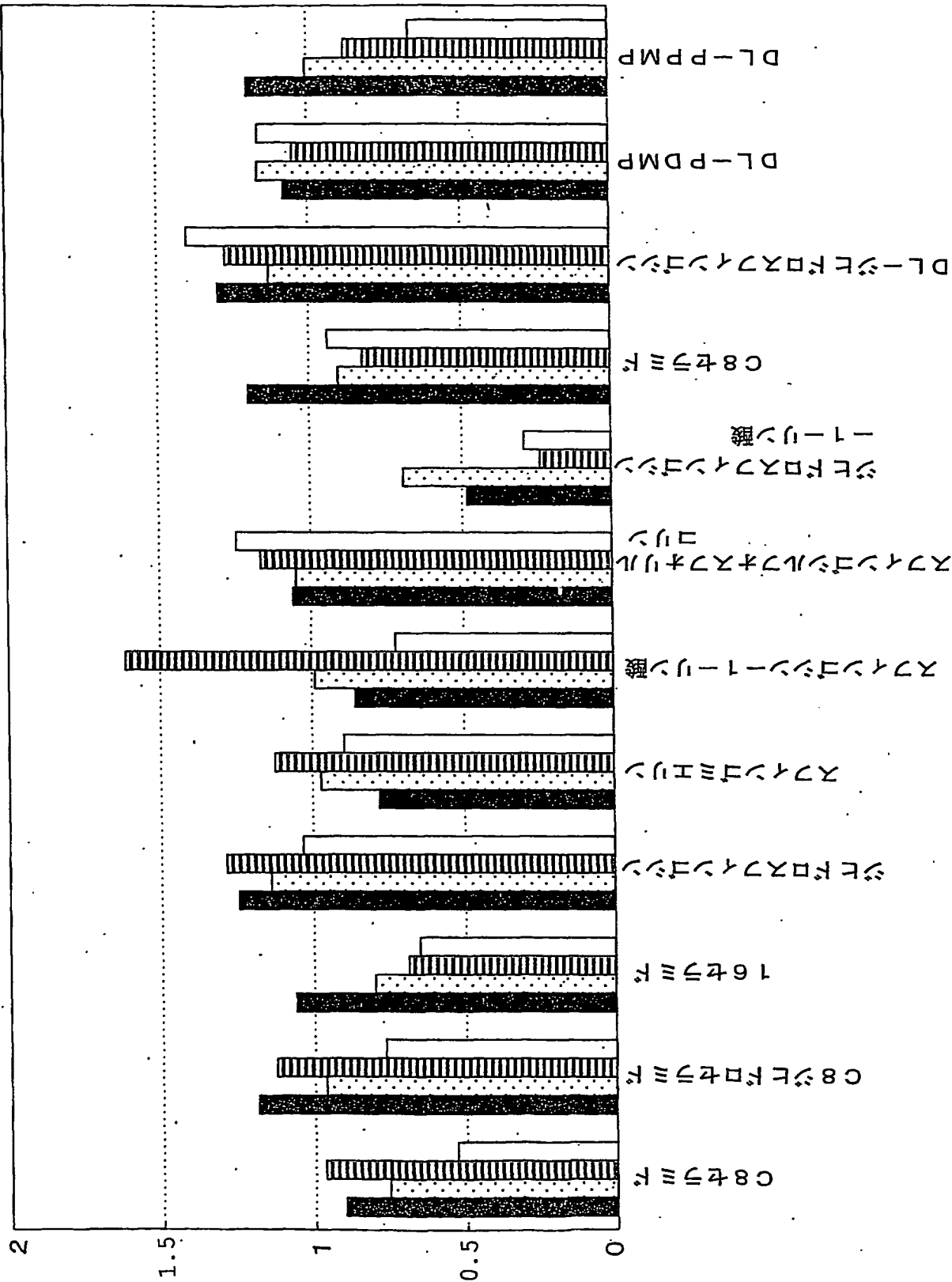
第 4 図



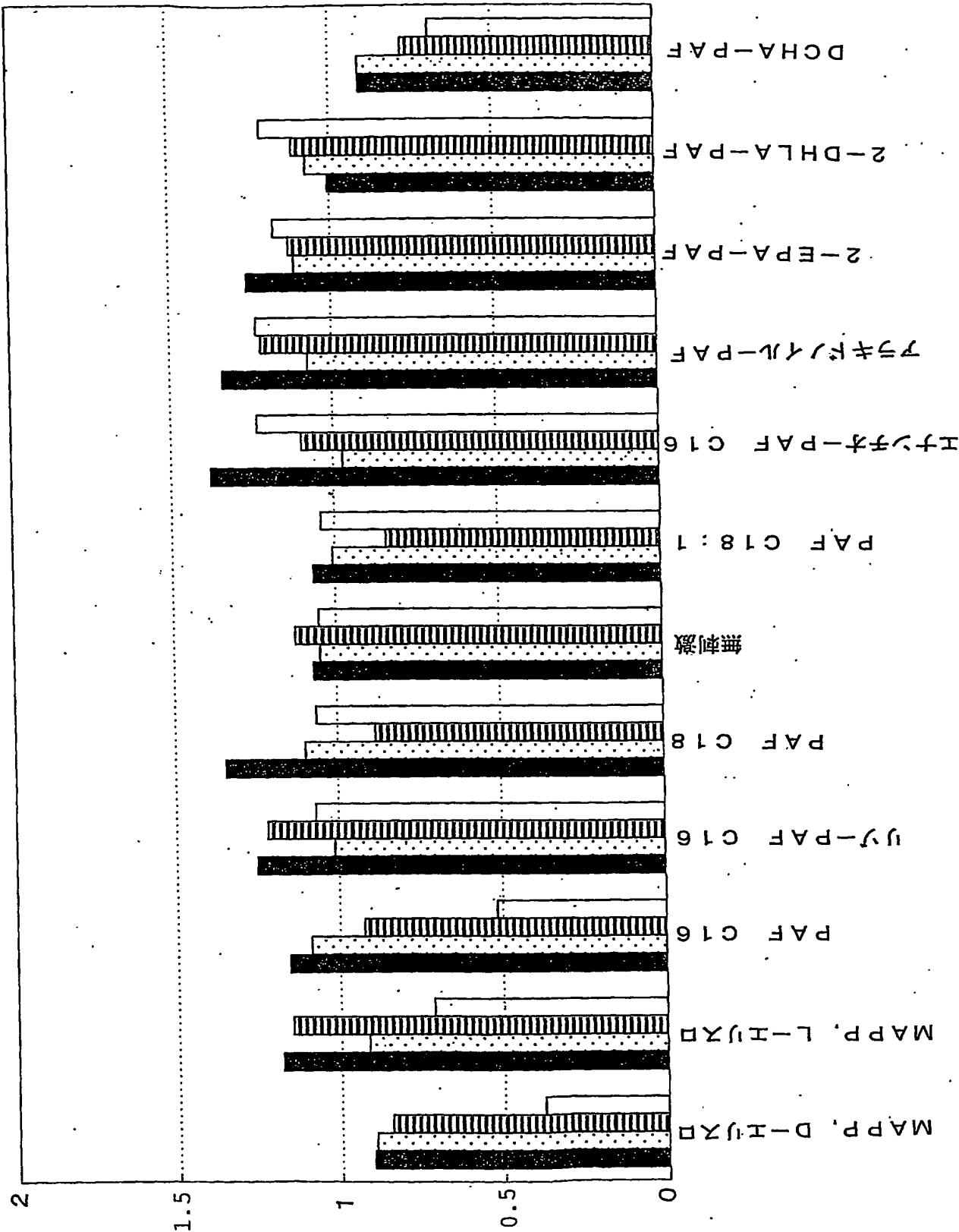
第 5 図



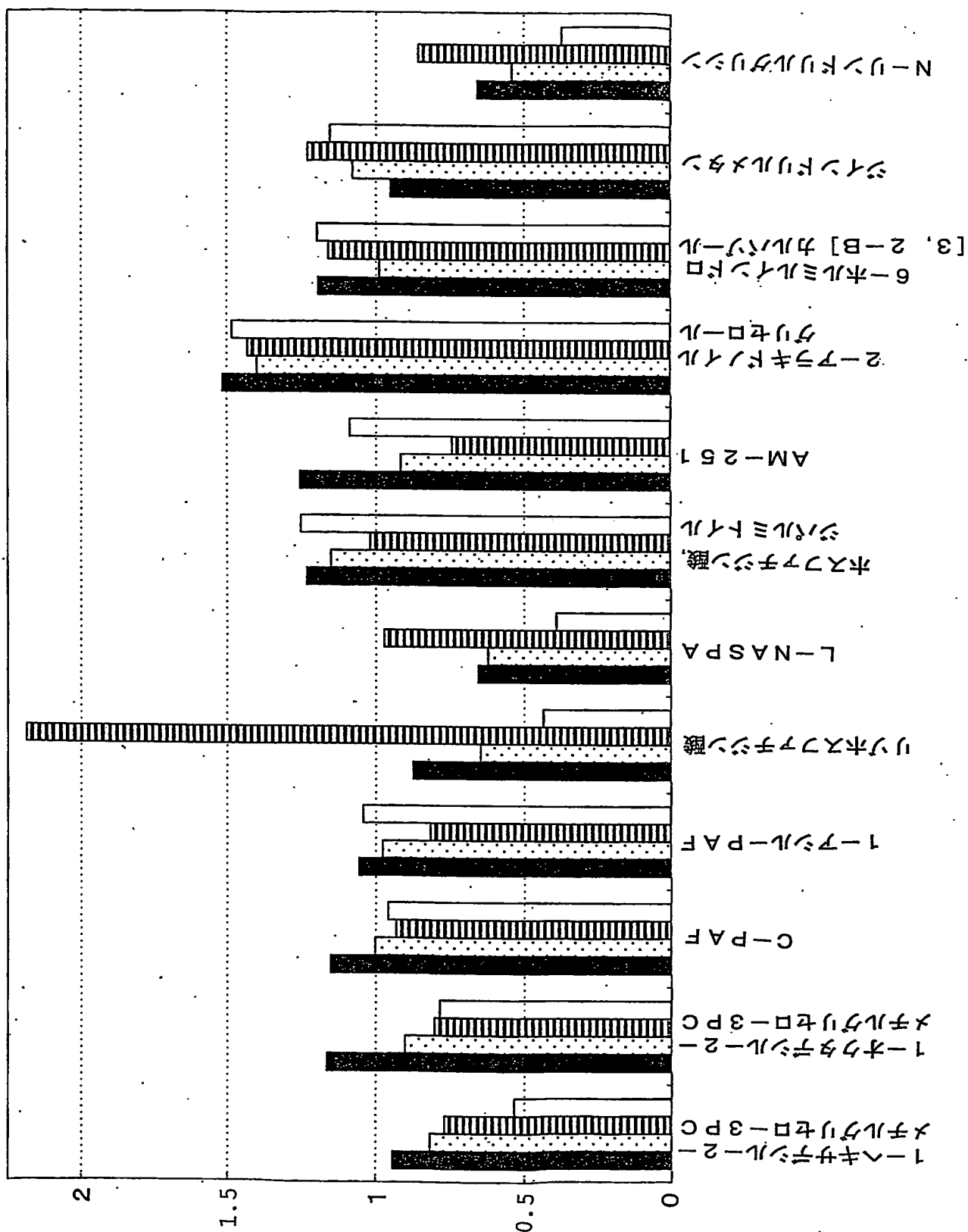
第 6 図



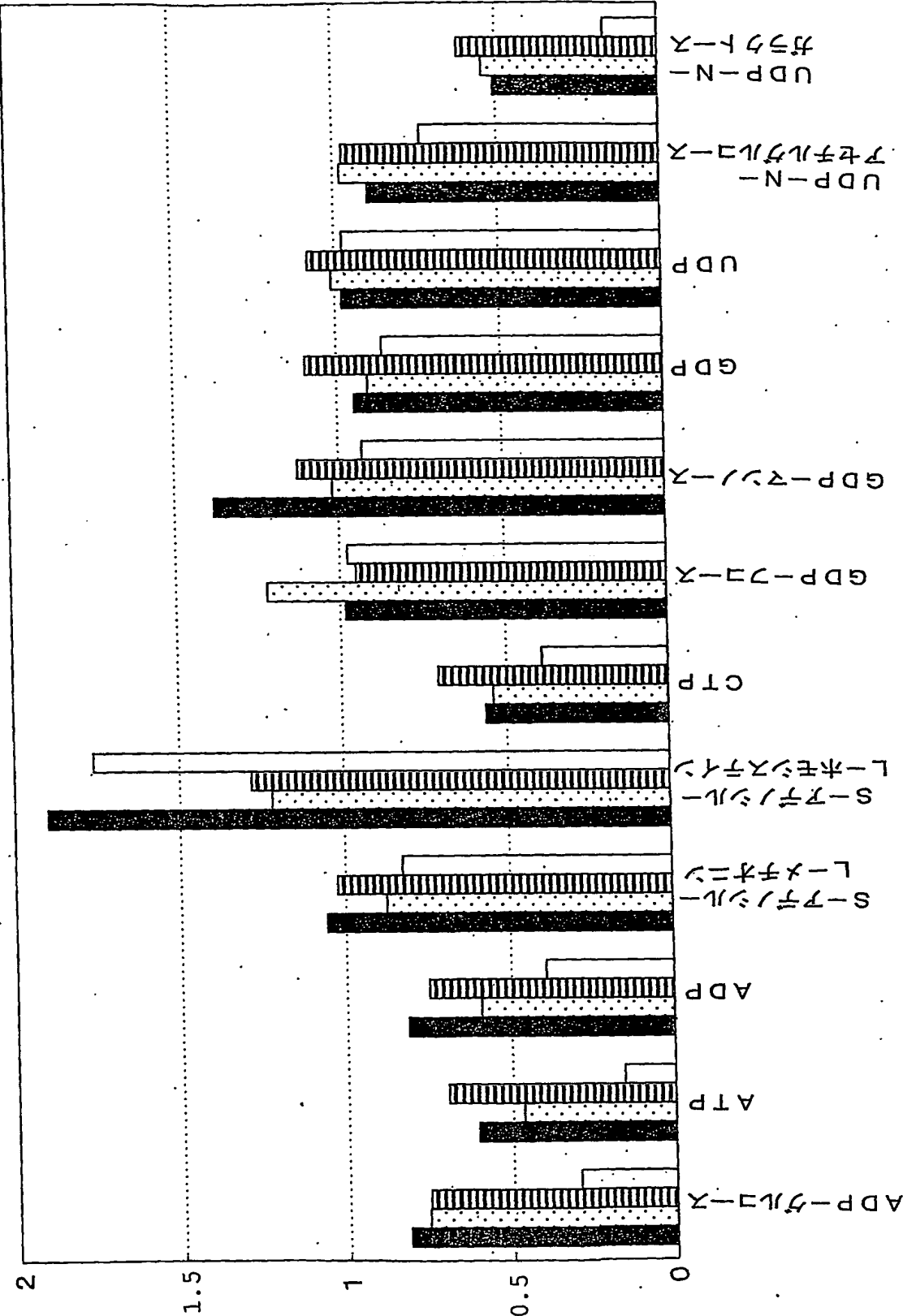
第 7 図



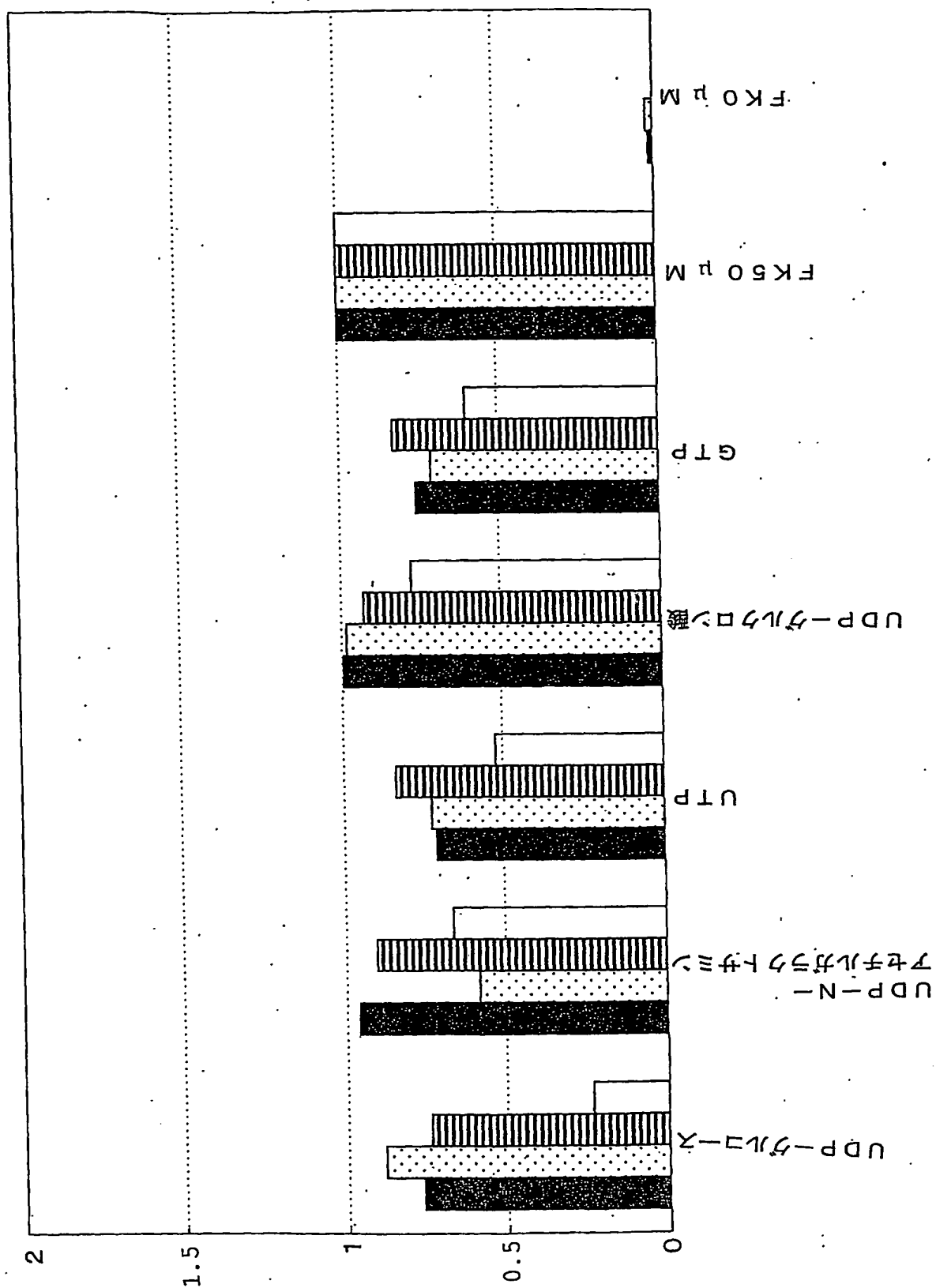
第 8 図



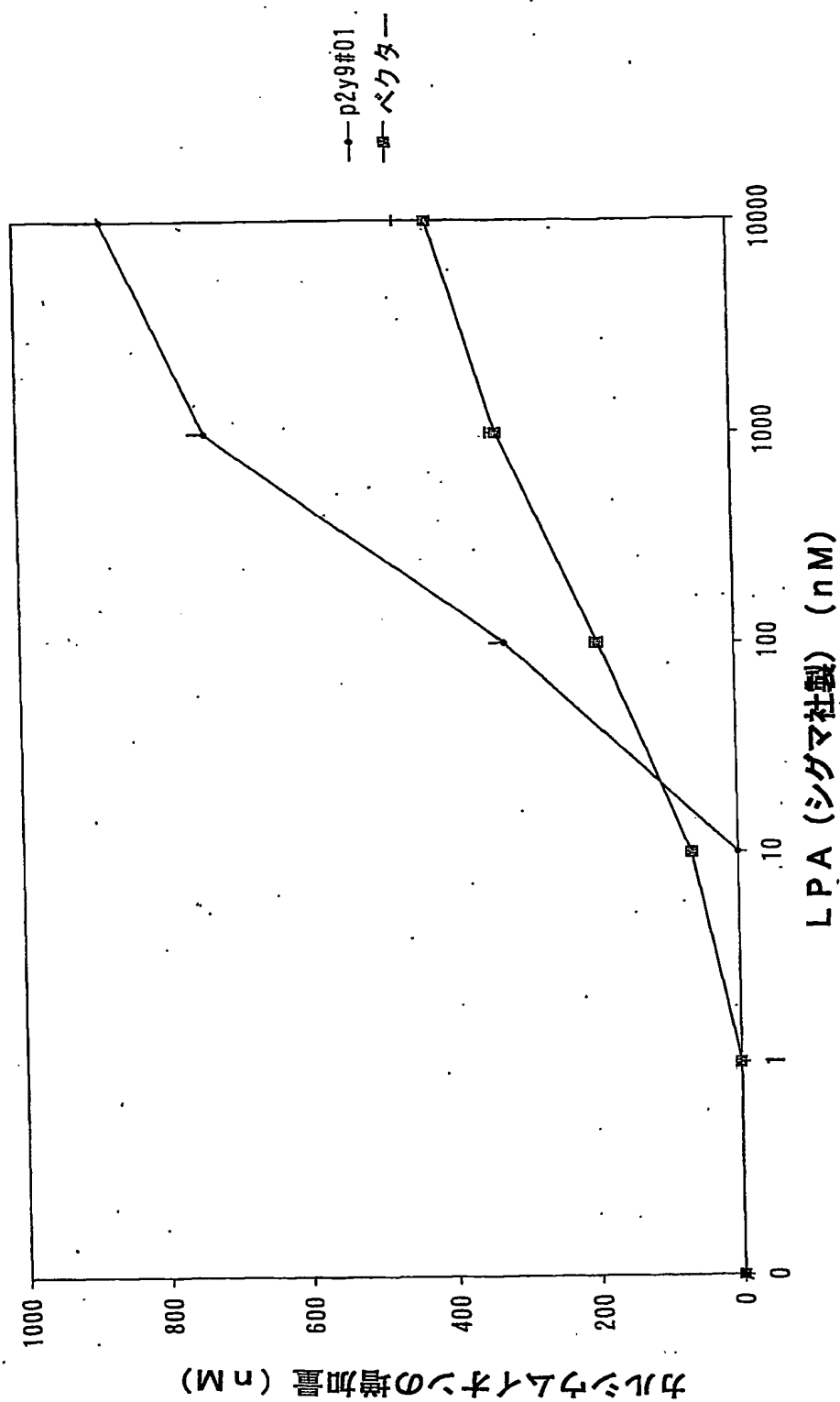
第 9 図



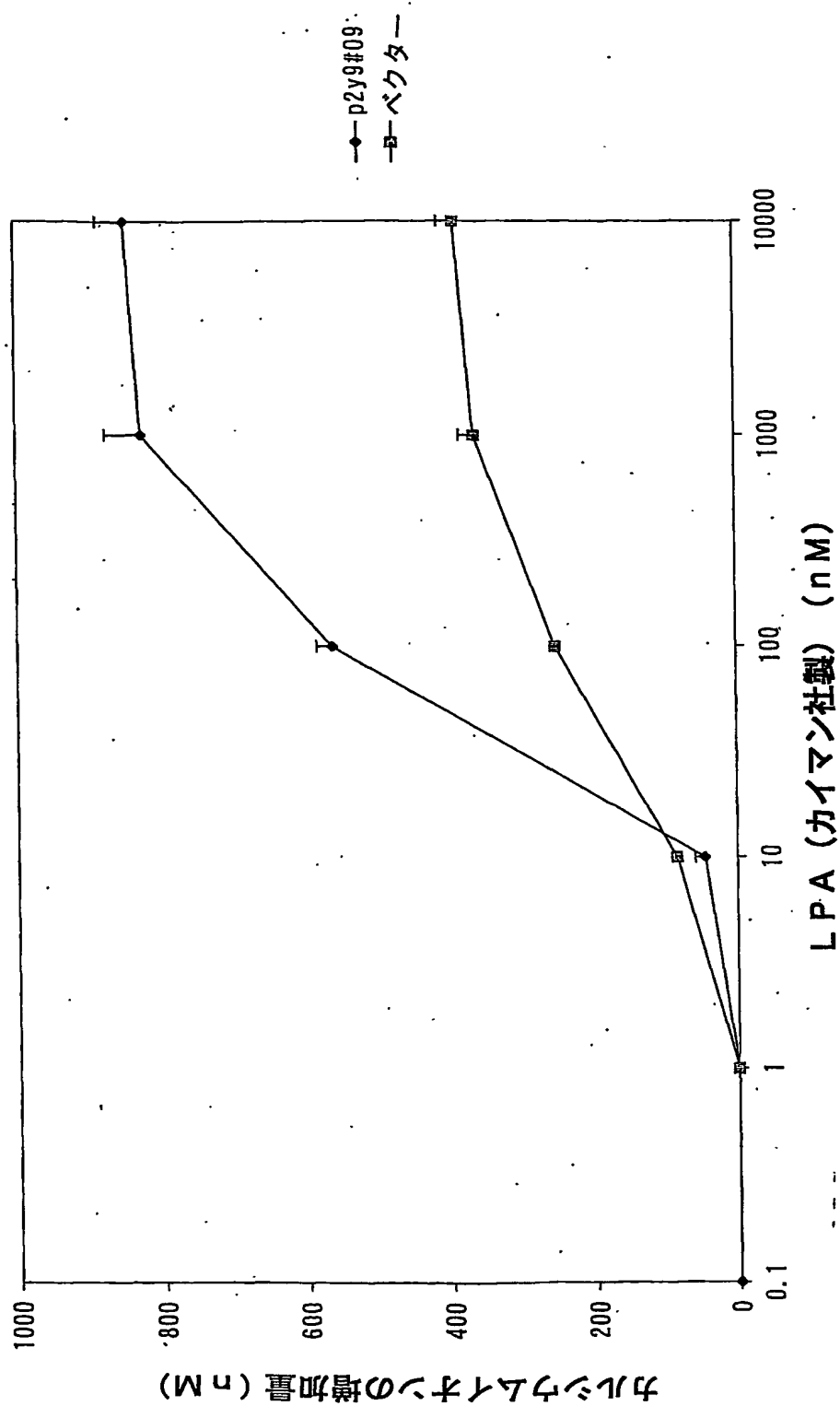
第 10 図



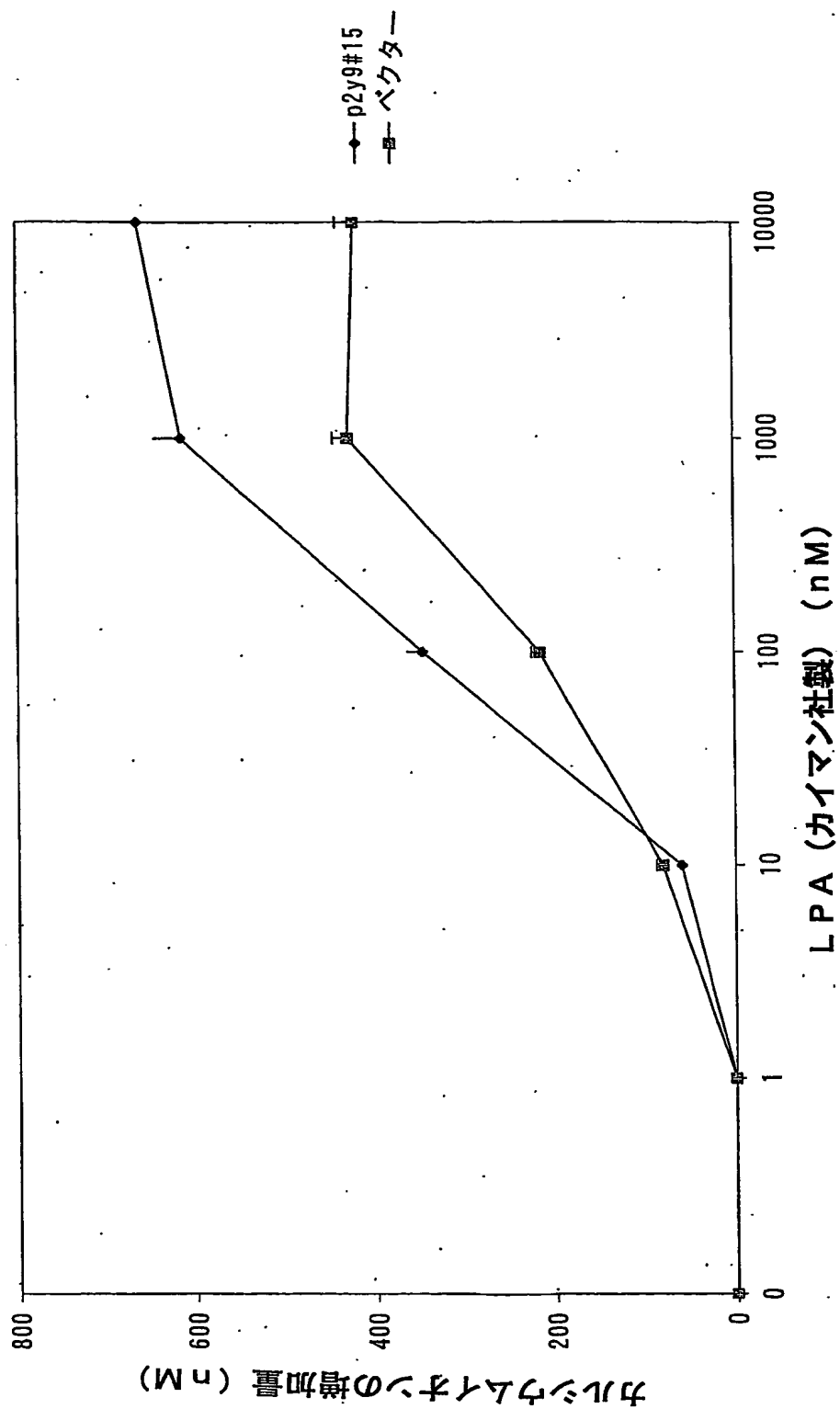
第 11 図



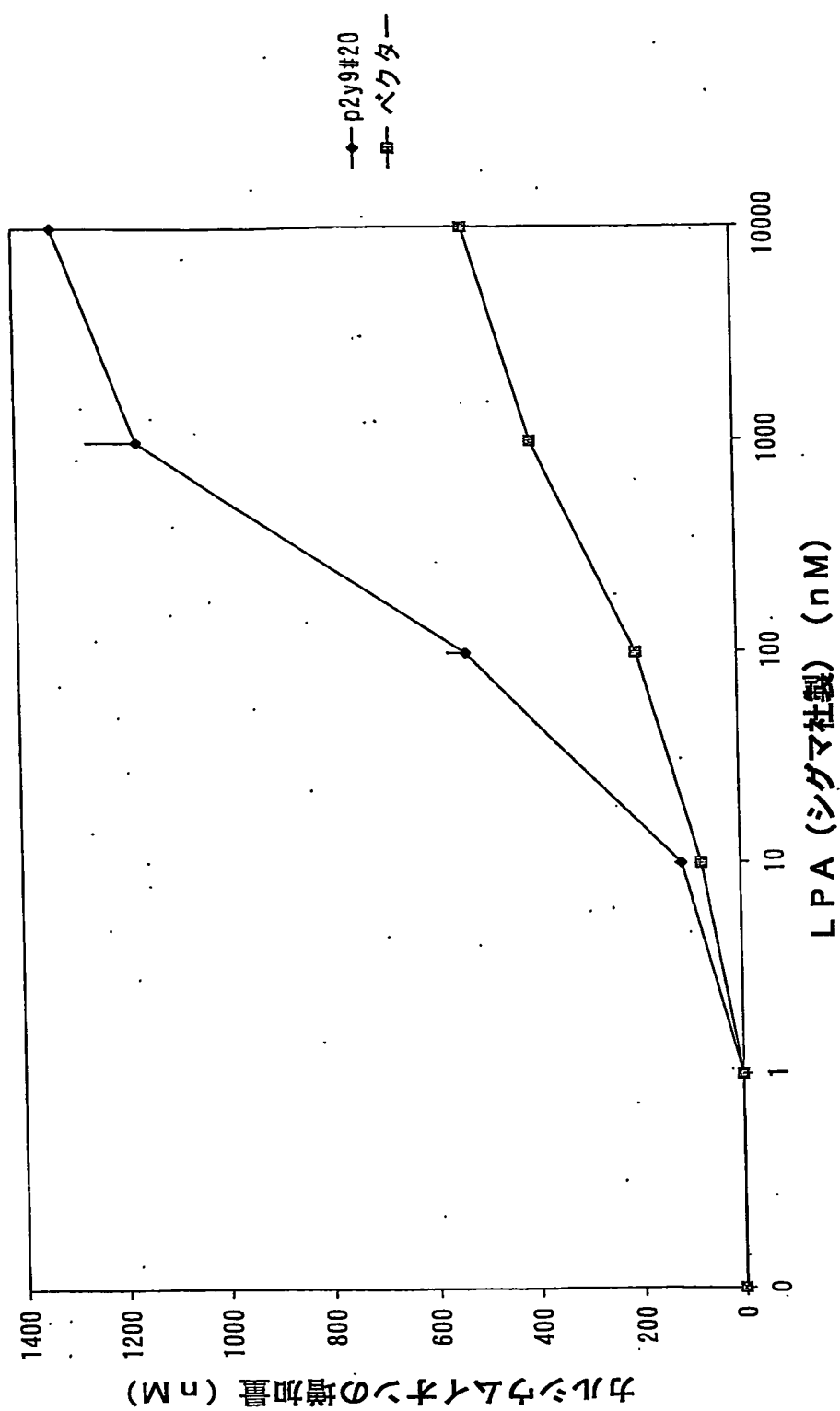
第 12 図



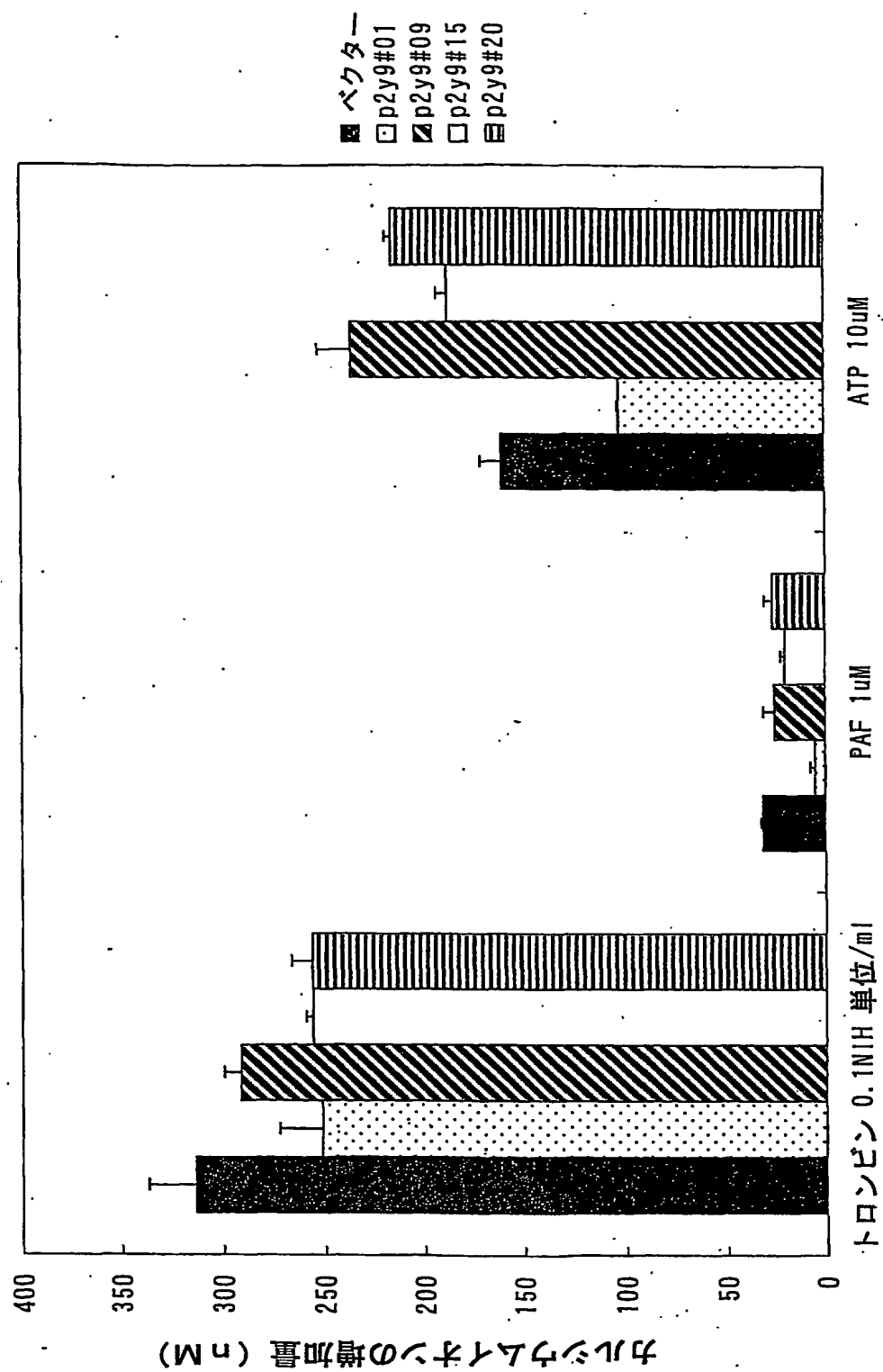
第 13 図



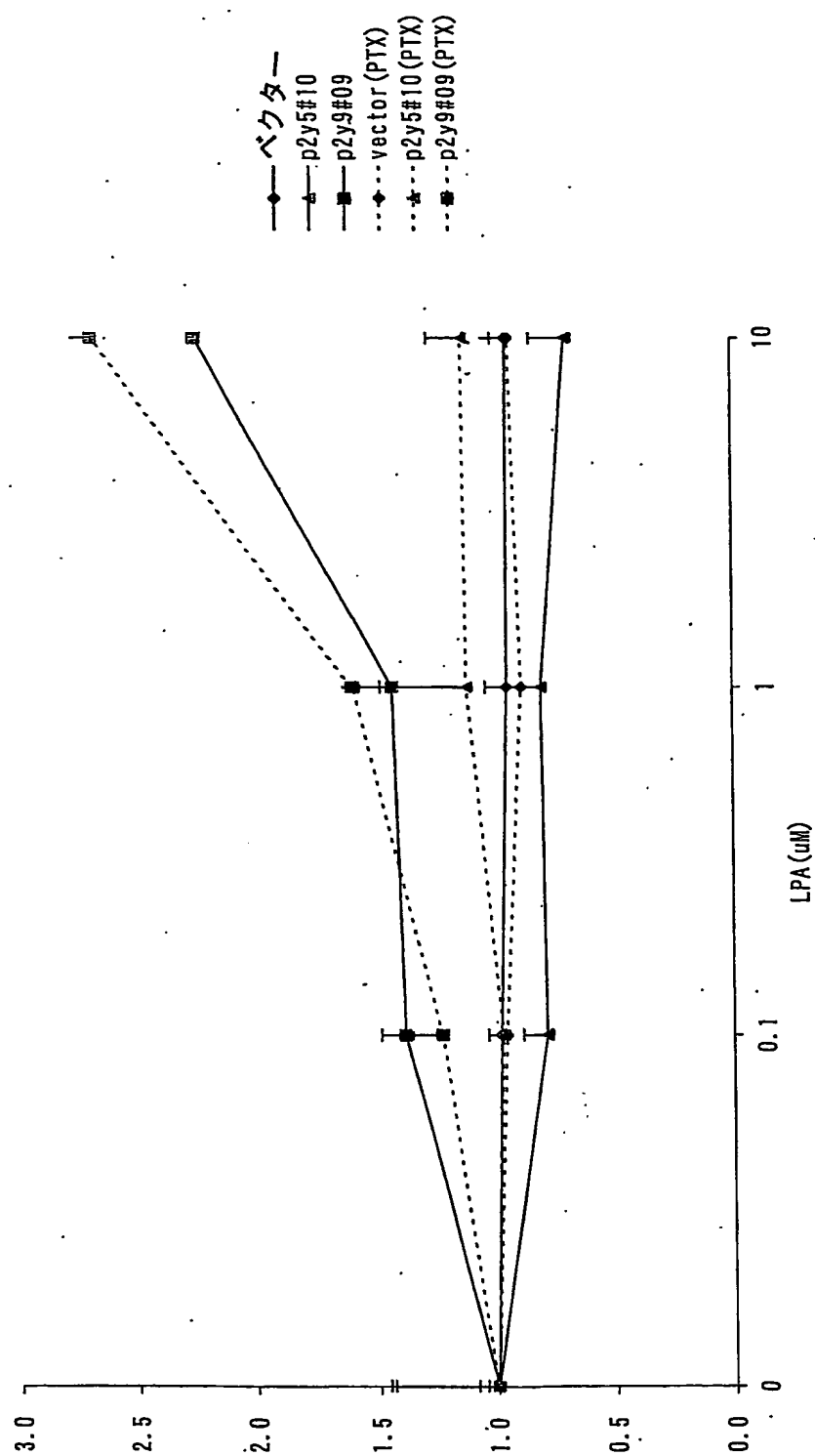
第 14 図



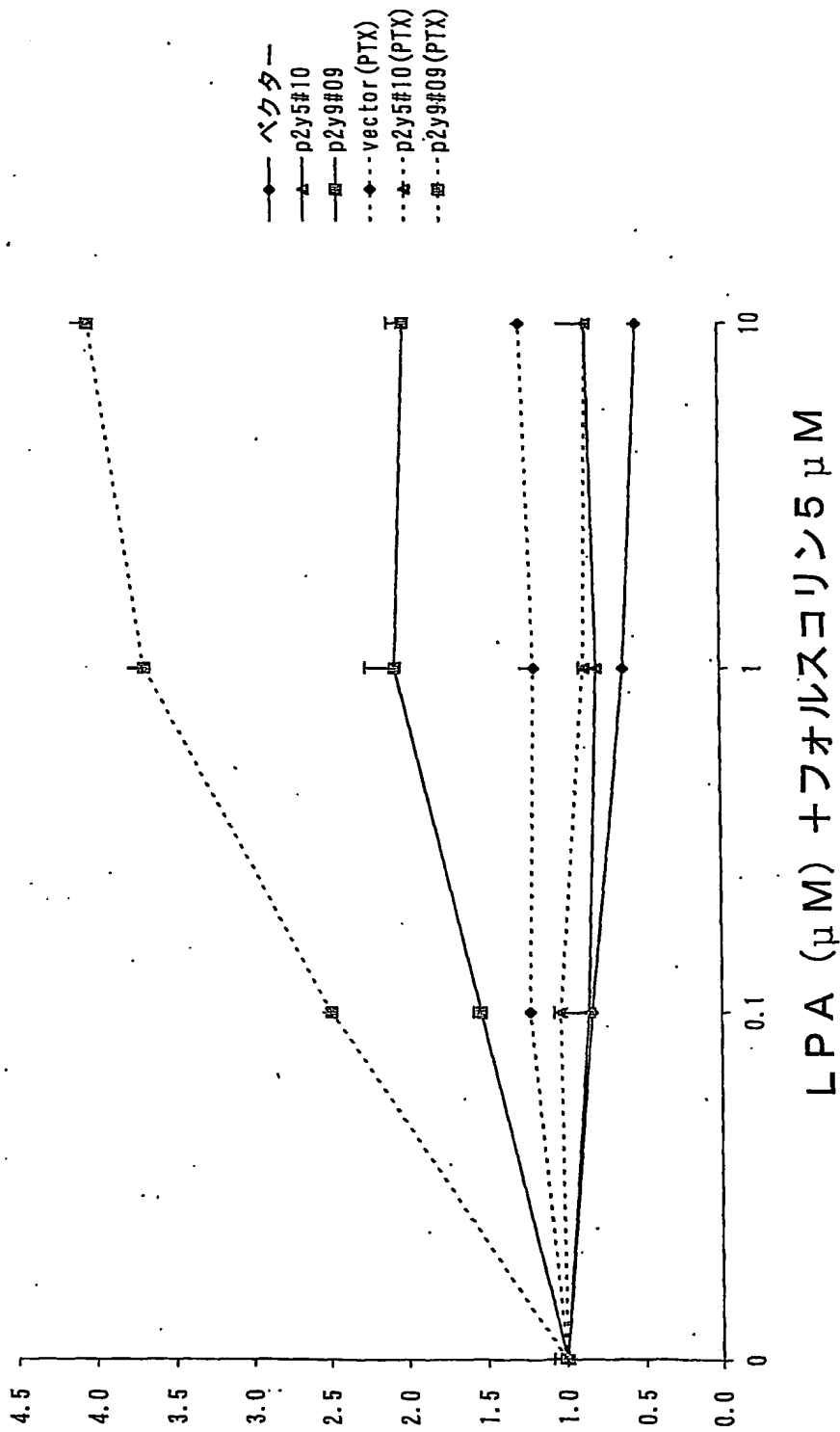
第 15 図



第 16 図



第 17 図



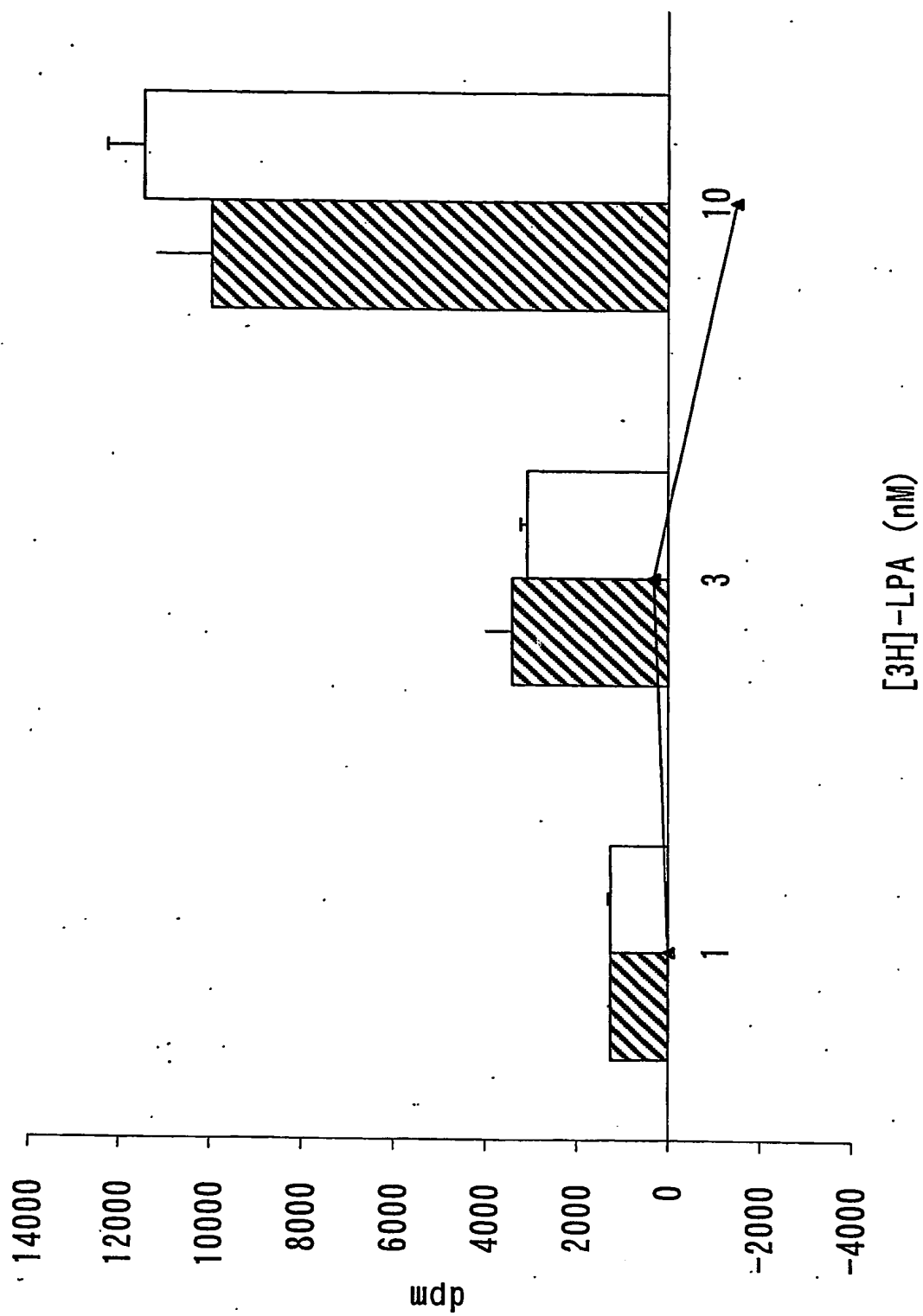
第 18 図

```

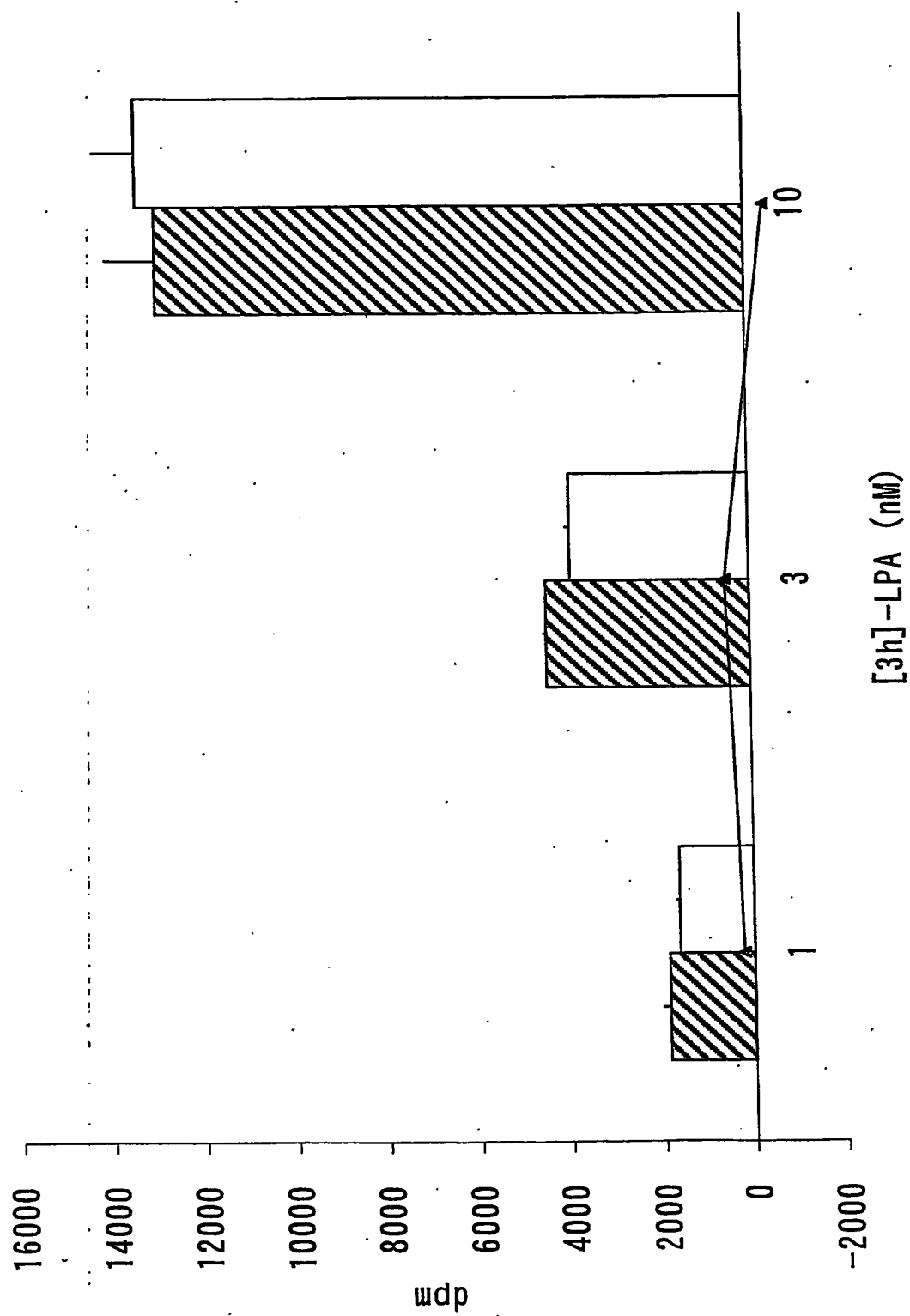
1' MGDRRFIDFQFQDSNSSLRPRLGNATANNTCIVDDSFKYNLNGAVYSVVFILGLITNSVS
      ..... * . ***** * * ..... * * * * *
1"      MVSVNSSHCFYNDSEFKYTLYGCMFSMVFLGLVSNCA
61' LFVFCFRMKMRSETAIFITNLAVSDLLFVCTLPFKIFYNFNRHWPFGDTLCKISGTAFIT
      ...* ...* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
39" IYIFICVLKVRNETTTTYMINLAMSDDLLEVFITLPFRIFYFTTRNWPFGDLLCKISVMLFYT
121' .NIYGSMFLFLTCISVDRFLAIVYPFRSRTIRTRNSAIVCAGVWILVLSGGISASLFSTIN
      * . * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
99" NMYGSILFLTCISVDRFLAIVYPFKSKTLRTKRNAKIVCTGVWLTIVIGGSAPAVFVQSTH
181' V--NNATTTCEGFSKRVKTYLSKITIFIEVVGFIIPILNVSCSSVVLRTLKPATLS
      *** . * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
159" , SQGNNASEACFENFPEATWKTYLSRIVIFIEIVGFFIPLILNVTCSMVLKTLTKPVTL
239' QIGINKKKVLKMITVHMAVFVVCVPYNSVLFLYALVRSQAITNCFLERFKIMYPITLC
      . * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
219" RSKINKTKVLKMI FVHLIIFCFCFVPYNINLILYSLVRTQT FVNCSVVAVRTMYPITLC
299' LATLNCCFDPIVYYFTLESFQKSFYINAHIRMESLFKTETPLITKPSLPAIQEEVSDQIT
      . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *
279" IAVSNCCFDPIVYYFTSDTIONS IKMKNWSVRRSDFRFSEVHGAENFIQHNLOTLKSKIF
359' NNGGELMLESTF
339" DNESAA

```

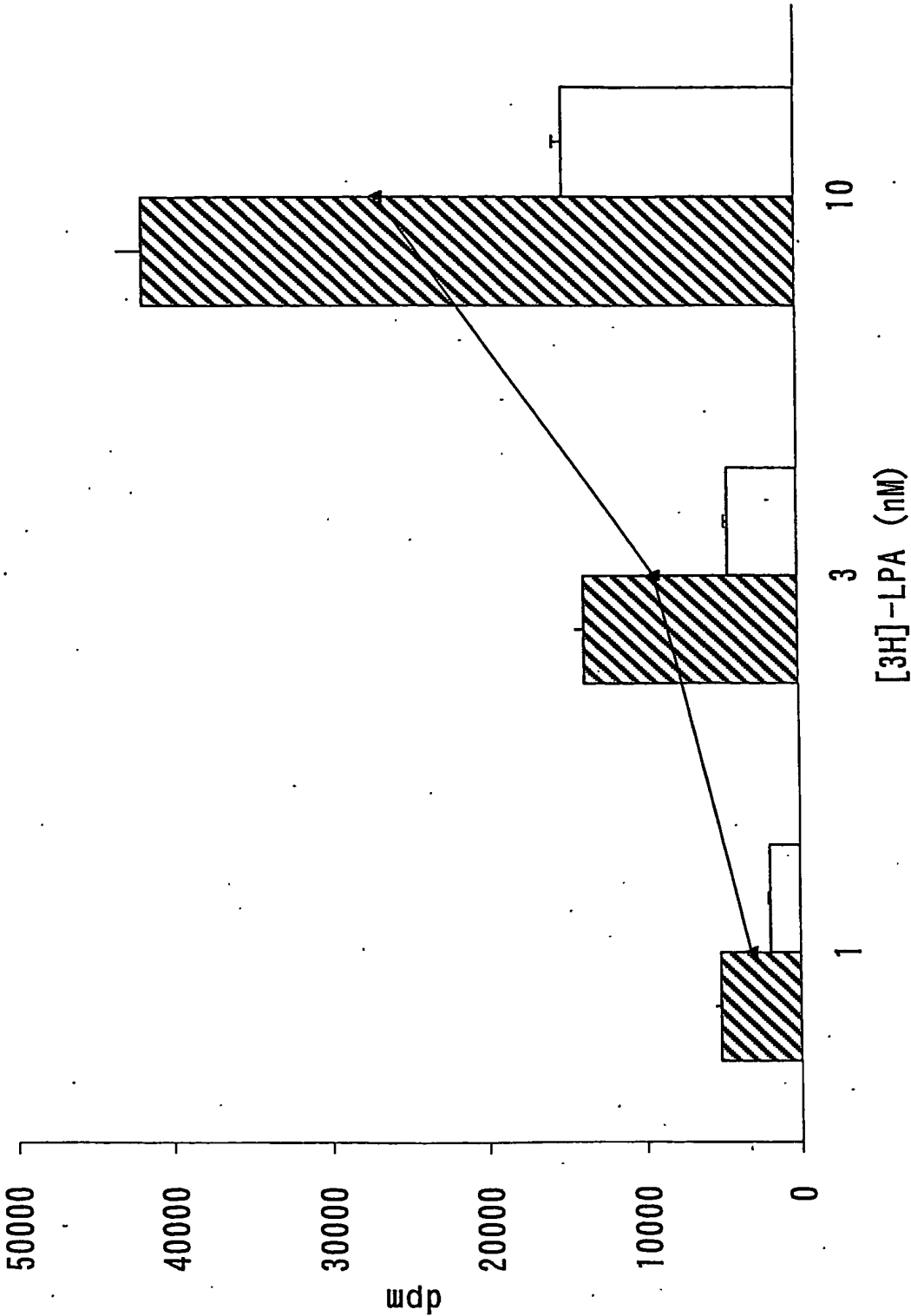
第 19 図



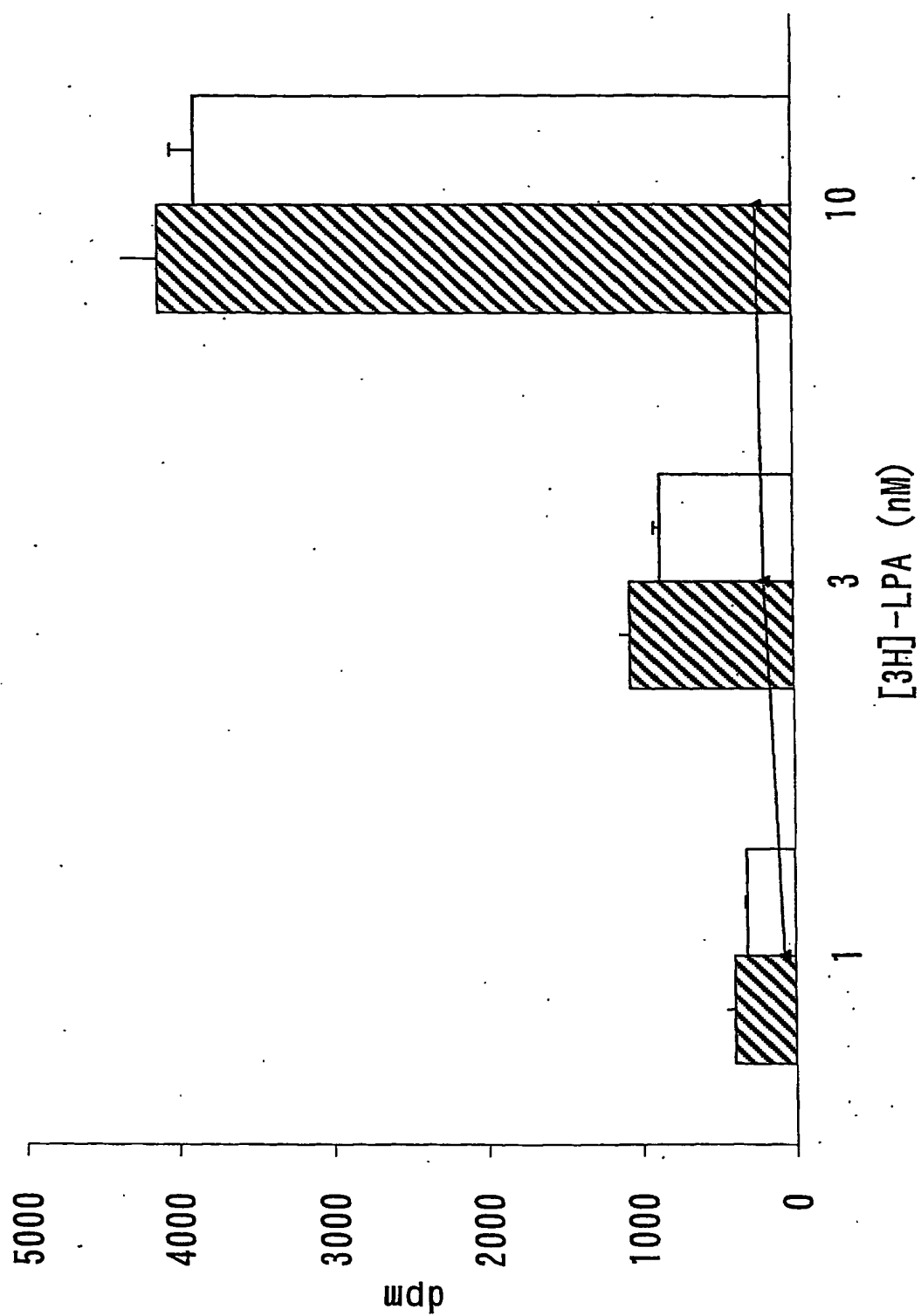
第 20 図



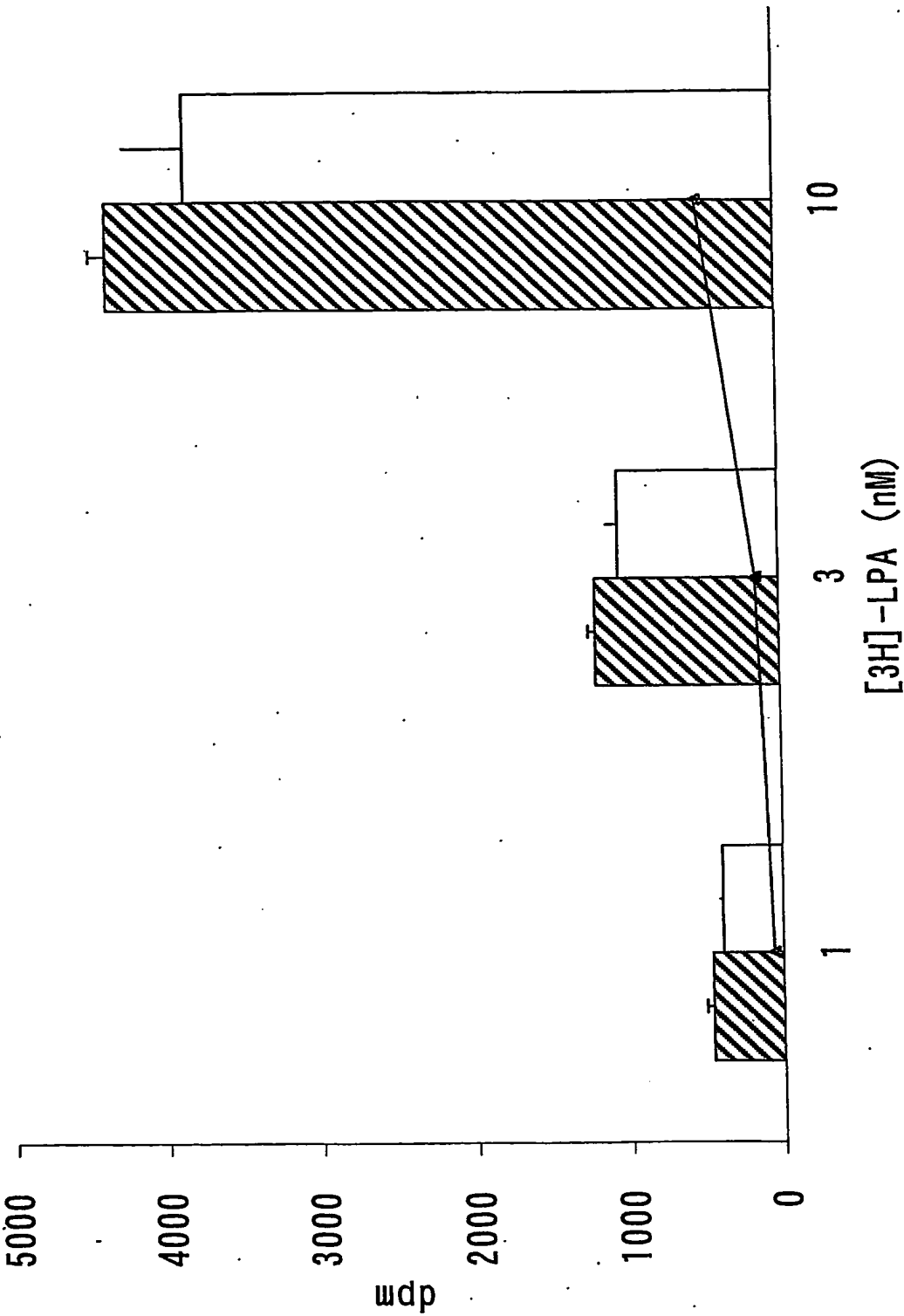
第 21 図



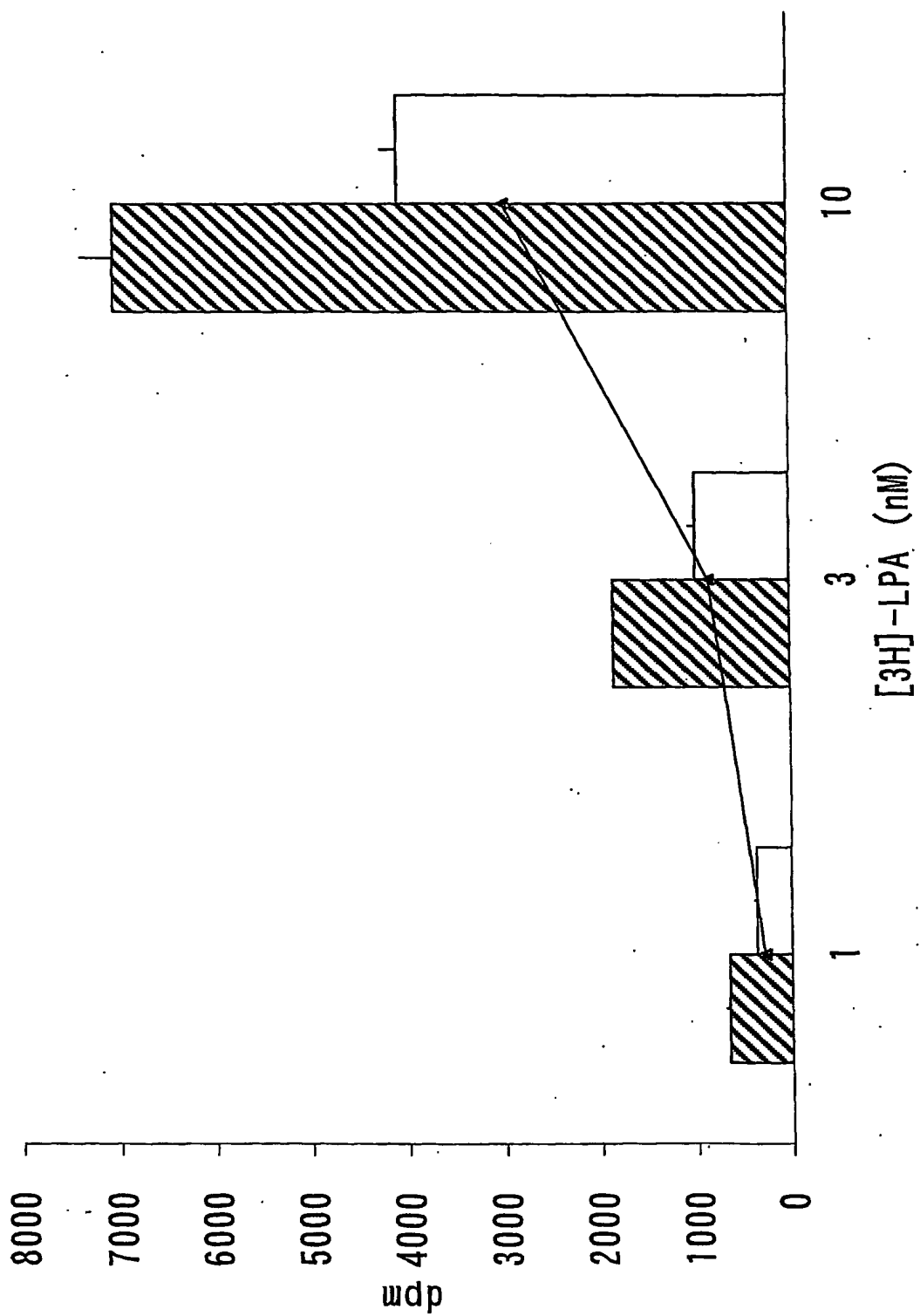
第 22 図



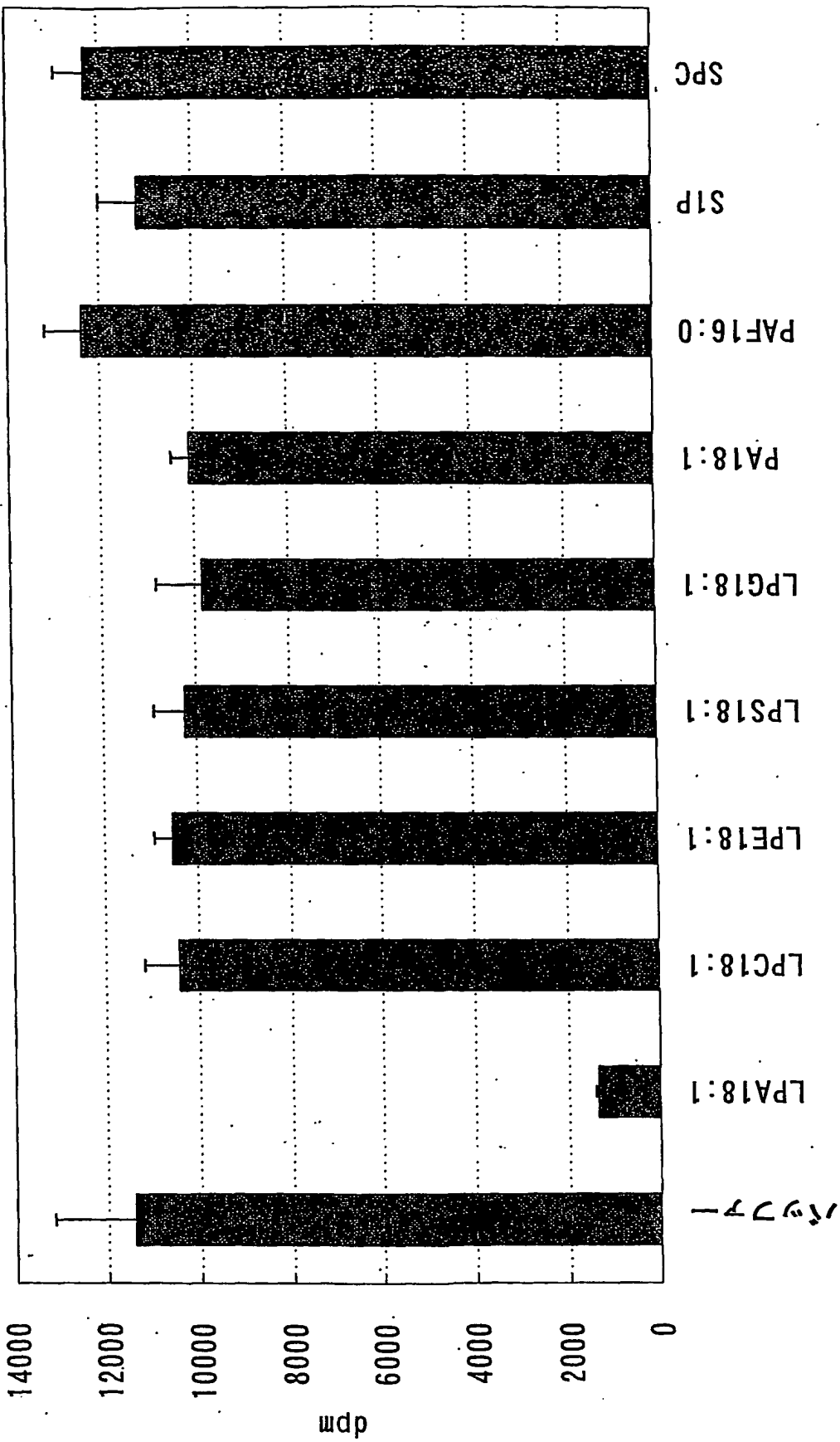
第 23 図



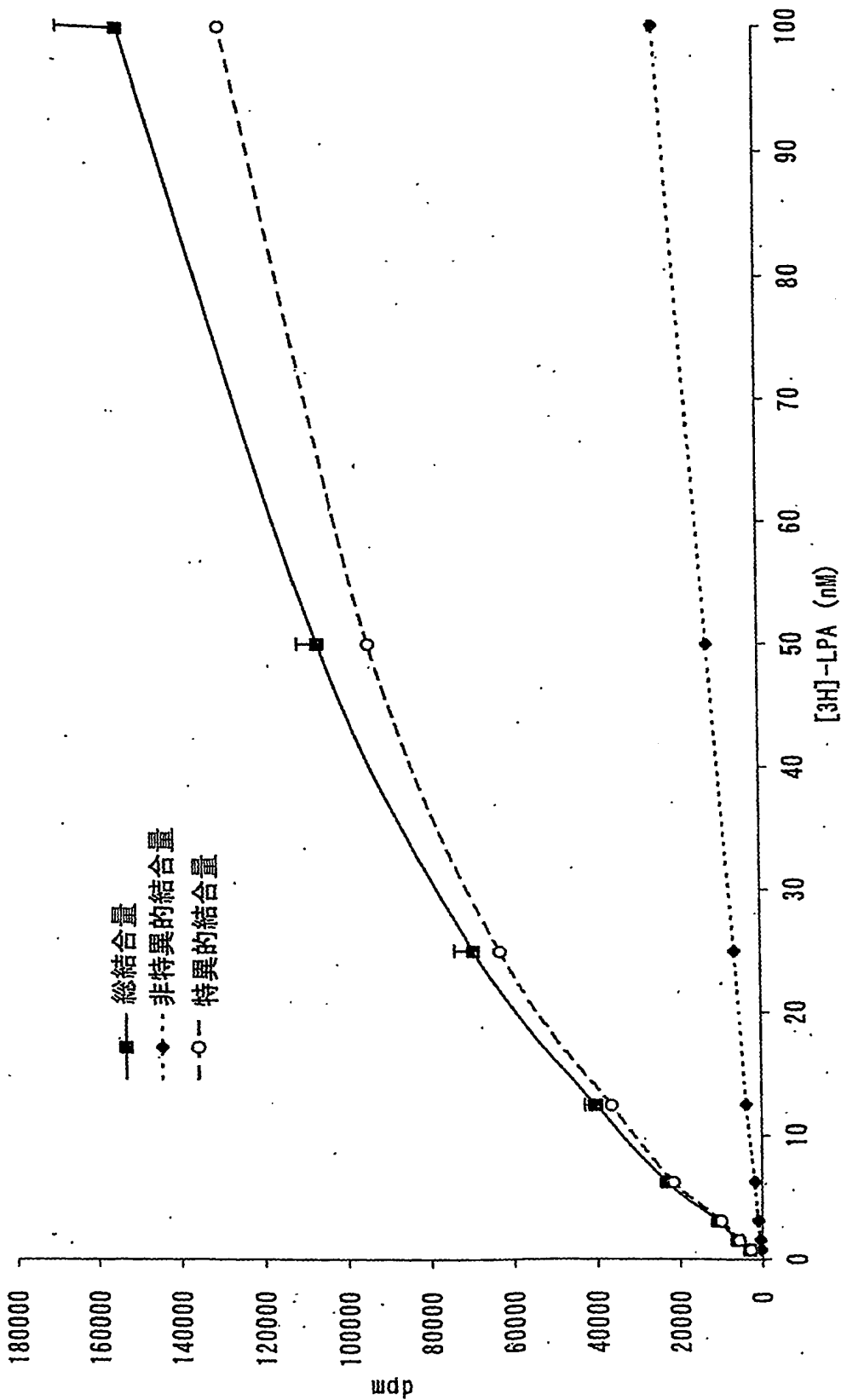
第 24 図



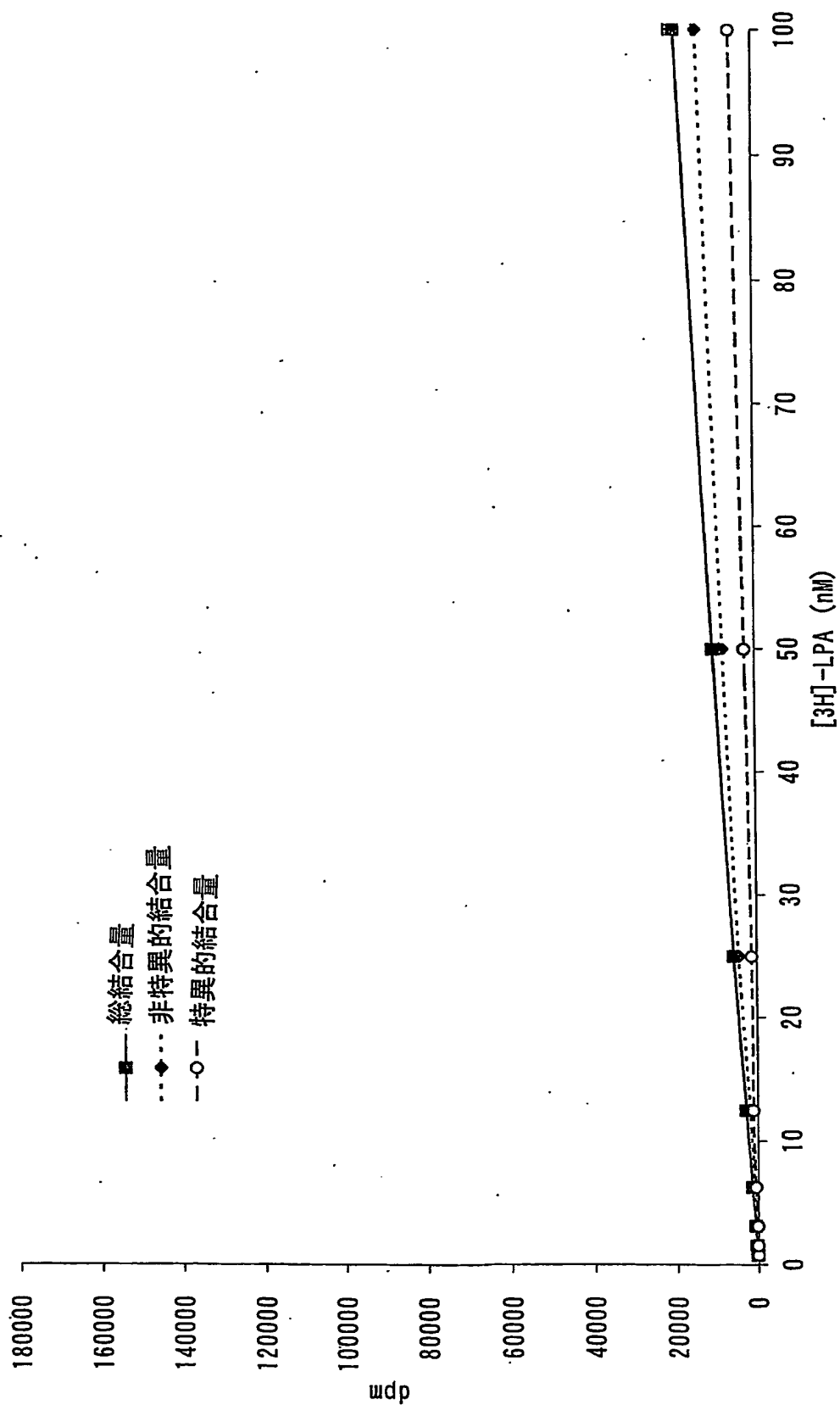
第 25 図



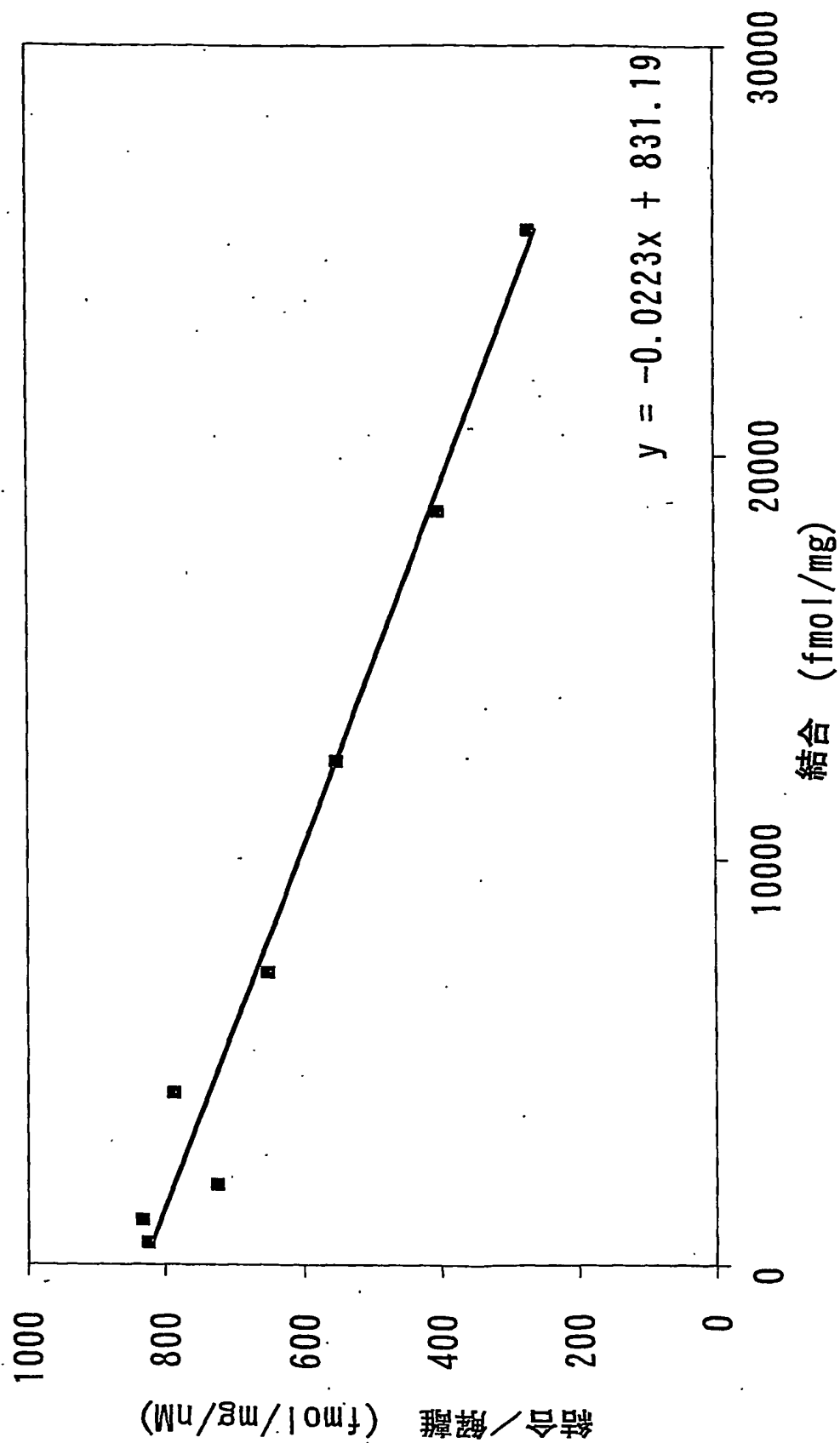
第 26 図



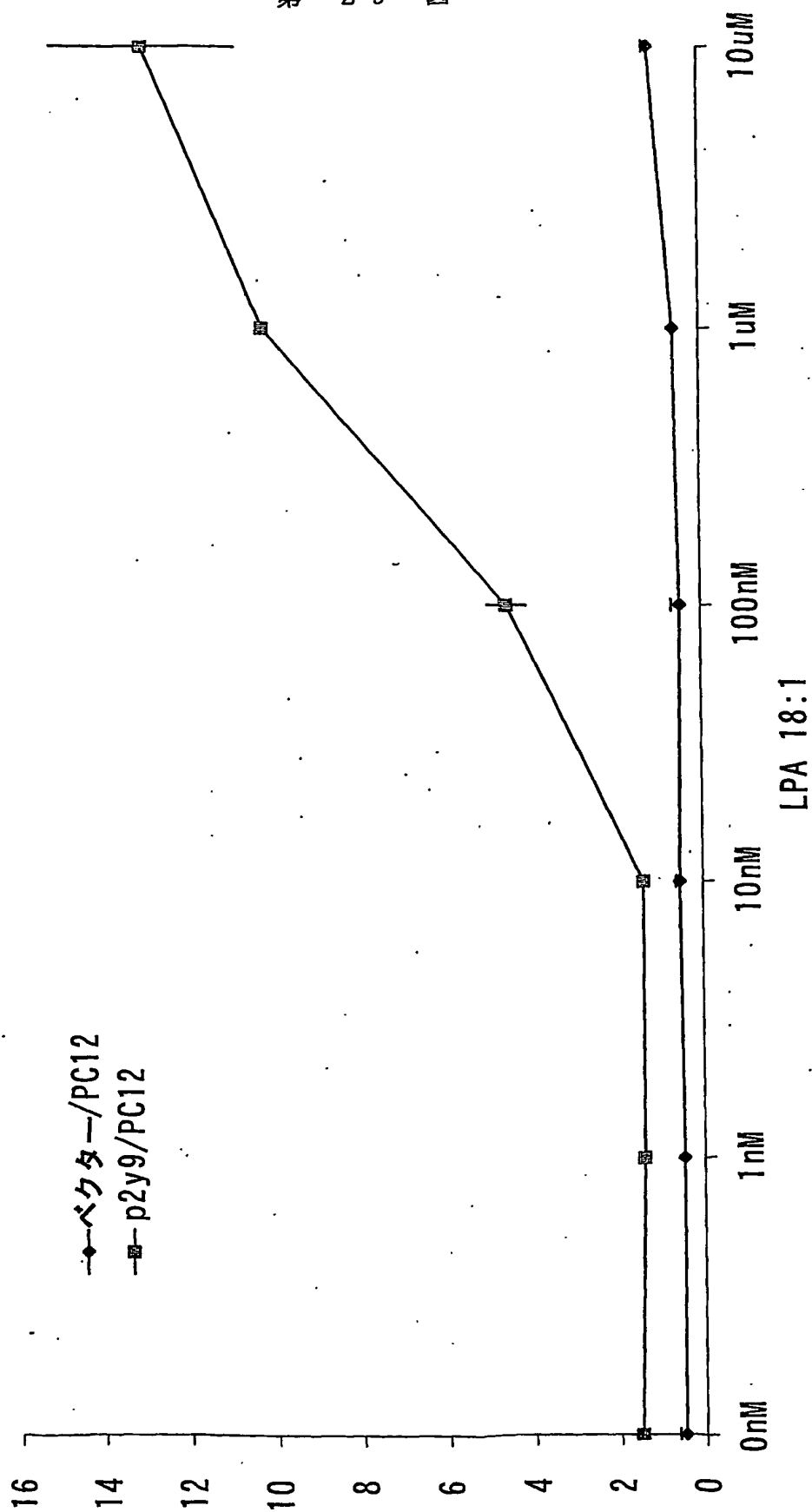
第 27 図



第 28 図



第 29 図



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A novel lysophosphatidic acid receptor

<130> JA907179

<150> JP2003-007657

<151> 2003-1-15

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 370

<212> PRN

<213> human

<400> 1

Met Gly Asp Arg Arg Phe Ile Asp Phe Gln Phe Gln Asp Ser Asn Ser

1

5

10

15

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Gly Asn Ala Thr Ala Asn Asn Thr Cys Ile

20

25

30

Val Asp Asp Ser Phe Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Ala Val Tyr Ser Val
35 40 45

Val Phe Ile Leu Gly Leu Ile Thr Asn Ser Val Ser Leu Phe Val Phe
50 55 60

Cys Phe Arg Met Lys Met Arg Ser Glu Thr Ala Ile Phe Ile Thr Asn
65 70 75 80

Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Phe Lys Ile
85 90 95

Phe Tyr Asn Phe Asn Arg His Trp Pro Phe Gly Asp Thr Leu Cys Lys
100 105 110

Ile Ser Gly Thr Ala Phe Leu Thr Asn Ile Tyr Gly Ser Met Leu Phe
115 120 125

Leu Thr Cys Ile Ser Val Asp Arg Phe Leu Ala Ile Val Tyr Pro Phe
130 135 140

Arg Ser Arg Thr Ile Arg Thr Arg Arg Asn Ser Ala Ile Val Cys Ala
145 150 155 160

Gly Val Trp Ile Leu Val Leu Ser Gly Gly Ile Ser Ala Ser Leu Phe
165 170 175

Ser Thr Thr Asn Val Asn Asn Ala Thr Thr Thr Cys Phe Glu Gly Phe

180

185

190

Ser Lys Arg Val Trp Lys Thr Tyr Leu Ser Lys Ile Thr Ile Phe Ile

195

200

205

Glu Val Val Gly Phe Ile Ile Pro Leu Ile Leu Asn Val Ser Cys Ser

210

215

220

Ser Val Val Leu Arg Thr Leu Arg Lys Pro Ala Thr Leu Ser Gln Ile

225

230

235

240

Gly Thr Asn Lys Lys Lys Val Leu Lys Met Ile Thr Val His Met Ala

245

250

255

Val Phe Val Val Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Val Leu Phe Leu Tyr

260

265

270

Ala Leu Val Arg Ser Gln Ala Ile Thr Asn Cys Phe Leu Glu Arg Phe

275

280

285

Ala Lys Ile Met Tyr Pro Ile Thr Leu Cys Leu Ala Thr Leu Asn Cys

290

295

300

Cys Phe Asp Pro Phe Ile Tyr Tyr Phe Thr Leu Glu Ser Phe Gln Lys

305

310

315

320

Ser Phe Tyr Ile Asn Ala His Ile Arg Met Glu Ser Leu Phe Lys Thr

325

330

335

Glu Thr Pro Leu Thr Thr Lys Pro Ser Leu Pro Ala Ile Gln Glu Glu
340 345 350

Val Ser Asp Gln Thr Thr Asn Asn Gly Gly Glu Leu Met Leu Glu Ser
355 360 365

Thr Phe
370

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07K14/705, G01N33/50, G01N33/15//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Brain F. O'Dowd, et al., Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes., Gene, 1997, Vol.187, pages 75 to 81 & SwissProt database Accession No. Q99677	1-3, 7-8 4-6
X A	Rodoiphe Janssens, et al., Cloning of a Human Heptahelical Receptor Closely Related to the P2Y5 Receptor., Biochem.Biophys.Res.Comm., 1997, Vol.236, pages 106 to 112 & SwissProt database Accession No. Q99677	1-3, 7-8 4-6
X A	WO 02/068591 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 06 September, 2002 (06.09.02), Fig. 4 (Family: none) & GenSeq database Accession No. ABG73513	1-3, 7-8 4-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
15 March, 2004 (15.03.04)

Date of mailing of the international search report
30 March, 2004 (30.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 853126 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 15 July, 1998 (15.07.98), Claims; Seq. 2 & JP 10-201492 A & US 6010877 A1 & GenSeq database Accession No. AAW62597	1-3, 7-8 4-6
X A	WO 02/053737 A1 (Asahi Kasei Corp.), 11 July, 2002 (11.07.02), Seq. 176 (Family: none) & GenSeq database Accession No. ABP61511	1-3, 7-8 4-6
X A	WO 02/061087 A2 (LIFESPAN BIOSCIENCES, INC.), 08 August, 2002 (08.08.02), Full text (Family: none) & GenSeq database Accession No. ABP81870	1-3, 7-8 4-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K14/705, G01N33/50, G01N33/15 //C12N15/09			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K1/00-C07K19/00, C12N1/00-C12N15/90			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/DDBJ/EMBL/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X A	Brain F. O'Dowd, et al., Cloning and chromosomal mapping of four putative novel human G-protein-coupled receptor genes. Gene, 1997, Vol.187, pp75-81 &SwissProt database Accession No. Q99677	1-3, 7-8 4-6	
X A	Rodolphe Janssens, et al., Cloning of a Human Heptahelical Receptor Closely Related to the P2Y5 Receptor. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1997, Vol.236, pp106-112 &SwissProt database Accession No. Q99677	1-3, 7-8 4-6	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 15. 03. 2004		国際調査報告の発送日 30. 3. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 素井一郎 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3446	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/068591 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) , 2002. 09. 06, Fig.4 (ファミリーなし) &GenSeq database Accession No. ABG73513	1-3、7-8 4-6
X A	EP 853126 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) , 1998. 07. 15, CLAIMS, Seq.2 &JP 10-201492 A &US 6010877 A1 &GenSeq database Accession No. AAW62597	1-3、7-8 4-6
X A	WO 02/053737 A1 (旭化成株式会社) , 2002. 07. 11, Seq.176 (ファミリーなし) &GenSeq database Accession No. ABP61511	1-3、7-8 4-6
X A	WO 02/061087 A2 (LIFESPAN BIOSCIENCES, INC.) , 2002. 08. 08, 文献全体 (ファミリーなし) &GenSeq database Accession No. ABP81870	1-3、7-8 4-6